

Aus dem Fachbereich 4 Klinische Medizin  
Medizinische Klinik und Poliklinik – Innere Medizin I –  
Universität des Saarlandes Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh

**Sequenz- und Expressionsanalyse einer subtraktiven  
Testis-cDNA-Bank zur Identifikation und molekularen  
Charakterisierung von Cancer-Germline-Antigenen**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINER DOKTORIN DER MEDIZIN  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2009

Vorgelegt von : Sandra Frühauf  
Geboren am 31. Juli 1966  
in Trier-Ehrang

1. Tag der Promotion:

2. Dekan:

3. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh

Inhalte der vorliegenden Arbeit werden publiziert

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
Bp	Basenpaare
CSF	Colony stimulating factors
CGA	Cancer-Germine-Antigen
CTL	cytotoxic T-lymphocytes
EBV	Epstein-Barr-Virus
EST	expressed sequence tag
G-CSF	Granulozyte-Colony stimulating factor
GM-CSF	Granulozyte-Makrophage-Colony stimulating factor
HGS	human gene signature
HK2	human kinesin 2
IFN	Interferon
IL-2	Interleukin-2
KIF	Kinesin-Superfamily-proteins
KLP	Kinesin-like-protein
KRP	Kinesin-related-protein
LCL	lymphoblastoid cell lines
MCAK	mitotic centromere-associated kinesin
mIG	Membran-Immunglobulin
NK	Natürliche Killerzellen
PBL	periphere blood lymphocytes
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
RACE	rapid amplification of cDNA-ends
SEREX	serological identification of antigens by recombinant expression cloning
Sub T	subtraktiver Testis-Klon
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TRP	tyrosinase-related-protein
XKCM1	Xenopus kinesin central motor 1

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>I. Zusammenfassung / Summary</b>	<b>7/8</b>
<b>II. Einleitung</b>	<b>9</b>
II.1. Tumorantigene und Cancer-Germline-Antigene	
II.2. Spezifische Immuntherapie	
II.3. Nachweismethoden für Cancer-Germline-Antigene	
II.4. Fragestellung und Ziel der Arbeit	
<b>III. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
III.1. Material	
III.1.1. Lösungen und Puffer	
III.1.2. Primer und Materialliste	
III.2. Methoden und Protokolle	
III.2.1. Subtraktive Testis-cDNA-Bank	
III.2.1.1. Ligation	
III.2.1.2. Transformation	
III.2.1.3. Bakterienkultur	
III.2.1.4. Glycerolstocks	
III.2.1.5. Plasmidpräparation	
III.2.1.5.1. STETL-Mini	
III.2.1.5.2. Spin Plasmid Mini nach Qiagen	
III.2.2. Insertanalyse	
III.2.2.1. Restriktionsenzymspaltung	
III.2.2.2. Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese	
III.2.2.3. Sequenzierung	
III.2.2.3.1. Sanger-Sequenzierung	
III.2.2.3.2. Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-	
Gel- Elektrophorese	
III.2.2.4. Sequenzvergleich und Datenbankrecherche	
III.2.2.4.1. Homologievergleich über DNASIS	
III.2.2.4.2. Datenbankanalyse über BLAST SEARCH,	
Genebank und Unigene	
III.2.3. Expressionsanalyse ausgewählter cDNAs	
III.2.3.1. RNA-Isolierung	

- III.2.3.1.1. cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase
    - III.2.3.1.2. RNA-Integritätskontrollen
  - III.2.3.2. RT-PCR
  - III.2.3.3. Northern Blots für Testis, Normalgewebe und Tumoren
    - III.2.3.3.1. Qiaex
    - III.2.3.3.2. Labeling von Sonden
    - III.2.3.3.3. Hybridisierungen („small scale“ und „large scale“)
    - III.2.3.3.4. Auswertung per Autoradiographie oder Phosphor Imager
    - III.2.3.3.5.  $\beta$ -Aktin-Kontrollen
  - III.2.4. Klonierung der Gesamtlänge aus dem Phagemid
    - III.2.4.1. RACE-PCR
  - III.2.5. Chromosomale Lokalisation
  - III.2.6. Expressionsanalyse large scale
    - III.2.6.1. RT-PCR der RACE Klone und Northern Blots (large scale)
  - III.2.7. Immunologische Charakterisierung
    - III.2.7.1. Klonierung eines Expressionskonstruktes zur Herstellung von Protein
      - Sub T 25 – pQE-30
    - III.2.7.2. SDS-PAGE und Western Blot
    - III.2.7.3. Tests mit allogenen Normal- und Tumorseren
      - zur Überprüfung der Antikörperreaktion
    - III.2.7.4. Prädiktion funktioneller Domänen

## IV. Ergebnisse

49

- IV.1. Nicht testisspezifische oder vorcharakterisierte Klone
  - Die Klongruppe sub T 1 - Ubiquitär exprimierte Klone oder Expression in Thymus
  - Die Klongruppen sub T 17, sub T 45 und sub T 50 – Klone mit hochrepetitiven Elementen
  - Der Klon sub T 38 - Bekannte und vorcharakterisierte Transkripte
- IV.2. Testisspezifische und bekannte Transkripte
  - Der Klon sub T 20 - Homologien zu Cathepsin L 2
  - Der Klon sub T 22 - Homologien zu Protamin
  - Der Klon sub T 24 - Homologien zu DKFZp43D0635
- IV.3. Unbekannte oder nicht näher charakterisierte Transkripte

IV.4.	Der Klon sub T 25	
	Sequenzanalyse von sub T 25	
	Expressionsprofil von sub T 25	
	Western Blot von sub T 25	
IV.5.	Der Klon sub T 37	
	Sequenzanalyse von sub T 37	
	Expressionsprofil von sub T 37	
IV.6.	Der Klon sub T 39	
	Sequenzanalyse von sub T 39	
	Expressionsprofil von sub T 39	
IV.7.	Der Klon sub T 44	
	Sequenzanalyse von sub T 44	
	Expressionsprofil von sub T 44	
<b>V.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>80</b>
V.1.	Suche nach neuen Cancer-Germline-Antigenen und Klonanalyse	
V.2.	Der Klon sub T 25 als partielles Transkript von Humanem Kinesin	
V.3.	Perspektiven	
<b>VI.</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>100</b>
<b>VII.</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>116</b>
<b>VIII.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>117</b>

## **I. Zusammenfassung**

Ein neuer immuntherapeutischer Ansatz in der Tumorthherapie ist die Entwicklung polyvalenter Vakzine. Dies erfordert die molekulare Charakterisierung vieler tumorassoziiierter Antigene. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation testisspezifischer Transkripte, die auch in humanen Tumoren exprimiert werden und somit die Kriterien eines Cancer-Germline bzw. Cancer-Testis-Antigens erfüllen. Klone aus einer subtraktiven Testis-cDNA-Bank bildeten die Grundlage für eine Basischarakterisierung: 1. Sequenzanalyse, 2. Expressionsanalyse neuer Transkripte per RT-PCR und Northern-Blot, 3. Überprüfung der Immunogenität durch Nachweis spezifischer Antikörper. Die Sequenz- und Datenbankanalyse von 55 Klonen ergab 16 differente Transkripte. 4 dieser Transkripte konnten jeweils neuen Splicing-Varianten schon bekannter Proteine zugeordnet und bezüglich Expressionsverhalten analysiert werden. Zwei Klone, sub T 37 und sub T 25, zeigten eine Expression in Tumoren und Testis. Der Klon sub T 37 zeigte in einem grossen Teilbereich eine Homologie zum ubiquitär exprimierten X-box-binding Protein XBP1; er wurde deshalb von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. So wurde nur der Klon sub T 25 näher charakterisiert. Sub T 25, der eine hohe Homologie zu einem bis dato unbekannten Kinesin-ähnlichem Protein aufwies, wird unseren Untersuchungen zufolge in Testis und Bronchialkarzinomen exprimiert, die teilweise gleichzeitig NY-ESO-1 koexprimieren. Die Analyse des RACE-Produktes von sub T 25 zeigte bis auf 8 unterschiedliche Nukleotide, die zum Austausch von zwei Aminosäuren in einer hochkonservierten Domäne seines Genproduktes führen würden, und einem deletierten carboxyterminalen Ende eine Übereinstimmung zum N-Terminus von humanem testisspezifischem Kinesin, einem zu diesem Zeitpunkt parallel in der Genbank eingetragenen, nicht näher charakterisiertem M-Kinesin, dem Mitglied einer Genfamilie, die essentiell in Signaltransduktion und Zelldifferenzierung involviert scheint. Spezifische Antikörper im Western Blot wurden mit den eingesetzten Seren nicht detektiert. Sekundär- und Tertiärstruktur wurden auf Grundlage der Aminosäuresequenz über PROSITE eruiert. Eine Leucin-Zipper-Domäne sowie weitere funktionelle Motive wurden identifiziert. Hinweise auf seine subzelluläre Lokalisation, eine Transmembranhelix und ein Ankermotiv für MHC-I-Moleküle konnten als wahrscheinlich vorausgesagt werden. Ein immunogenes Potential ist denkbar. Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit erstmals eine Assoziation von humanem Kinesin mit Tumoren beobachtet. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse handelt es sich bei sub T 25 um ein Cancer-Germline-Gen, das möglicherweise für ein Cancer-Germline-Antigen kodiert. Seine vollständige immunologische Charakterisierung wäre ein wichtiger Schritt zur Abschätzung seiner Bedeutung für immuntherapeutische Interventionen.

## Summary

Expression analysis of a subtractive testis cDNA library for the identification and characterisation of cancer-germline antigens.

The development of polyvalent vaccines is a novel approach in tumor therapy. A prerequisite for a polyvalent vaccine is the molecular characterisation of a sufficient number of tumor-associated antigens. The aim of this thesis was the identification and characterization of testis-specific transcripts which are also expressed in human tumors thus fulfilling the criteria for a so-called cancer-testis or cancer-germline genes. For this purpose a subtractive testis cDNA library was used. This library represents transcripts only present in testis and not present in other healthy human tissues. Clones derived from this library were characterised by: 1) sequence analysis, 2) expression analysis by RT-PCR and Northern blotting, 3) immunoreactivity with serum antibodies. Sequence analysis revealed that 55 clones derived from this subtractive testis library represented 16 different transcripts. Four clones coded for hitherto unknown transcripts of known proteins, and their expression in different tissues was examined. From these, only two clones, sub T 37 and sub T 25, showed an expression in tumors and testis. The transcripts of clone of sub T 37 showed in a greater region high homology to x-box-binding protein XBP1, which is expressed ubiquitously. For this reason sub T 37 was excluded from further studies which focused on the characterization of clone sub T 25. Sub T 25 showed a strong homology with a kinesin-like-protein, which was unknown at that time. Based on our results, sub T 25 is expressed in testis and lung cancer, some of which co-expressed the cancer-testis antigen NY-ESO-1. The analysis of sub T 25 RACE product showed a deletion of the C-terminal end of the protein and, in addition, 8 differences in the nucleotide sequence, leading to the change of two amino acids in a highly conserved domain of this gene product. The N-terminal end of this specific kinesin was identical to the gene bank entry which was not well characterized at that time. By homology analysis sub T 25 belongs to a family of genes which are involved in and appear to be essential for signal transduction and cell differentiation. Sub T 25-specific antibodies could not be detected in patients' sera by Western blot technique. Secondary and tertiary structure was defined based on the sequence of amino acids using PROSITE, a prediction software that predicted a leucine zipper domain and further functional motives. For example, markers for subcellular localization, a transmembrane helix and an anchor motive for MHC-class-I-molecules were predicted suggesting an immunogenicity of sub T 25.

In summary, our study is the first to describe an association of a human kinesin with human tumors. The data presented here identify sub T 25 as a new member of the kinesin family and a cancer-germline gene. The complete immunologic characterization of sub T 25 will show whether this gene codes for an immunogenic cancer-germline antigen which would make it a possible target for specific immunotherapeutic interventions.



## II. Einleitung

### II. 1. Tumorantigene und Cancer-Germline-Antigene

Tumorerkrankungen sind in Europa die zweithäufigste Todesursache. Dominierend sind dabei die Krebserkrankungen der Lunge und der Brust (PARKIN et al., 1997). Die Behandlung onkologischer Erkrankungen orientiert sich heute je nach Tumorentität und Tumorstadium an einem jeweils individuell erstellten interdisziplinären Gesamttherapiekonzept. Nach bewährten etablierten oder experimentellen Schemata in multizentrischen Studien kommen neben der Polychemotherapie mit variierenden Zytostatika auch additive, ablative oder antagonistische Hormontherapie, sowie supportive und adjuvante Therapien zur Anwendung (WWW.ONKOLOGIE2000.de), die aber oft mit im günstigsten Fall relativer Spezifität zu Tumorzellen unspezifisch wirken. In fortgeschrittenen Stadien bilden Remissionen insbesondere bei soliden Tumoren die Ausnahme. Da die bisher erzielten Heilungserfolge durch den Einsatz klassischer Therapiemethoden eingeschränkt bleiben, sind neue Konzepte gefragt. Die Erforschung von Abläufen zwischen Tumorzelle und Immunsystem erlaubt heute die Erprobung und teilweise bereits den zugelassenen klinischen Einsatz spezifischer molekularer Therapien. Diese bieten prinzipiell eine ideale therapeutische Option, denn sie stellen die Heilung bislang nicht therapierbarer Malignome in Aussicht. Auf intrazellulärer Ebene wirken kleine Moleküle vor allem Tyrosinkinaseinhibitoren rezeptorabhängig auf deregulierte Signaltransduktionswege. Immer mehr halten an der Zelloberfläche angreifende rekombinant hergestellte monoklonale Antikörper Einzug in die Klinik. Die Entdeckung neuer menschlicher Tumorantigene hat auch zu einer Erneuerung von Impfstrategien geführt.

Vor diesem Hintergrund gewinnen neue **immuntherapeutische Ansätze** an Bedeutung. Die Grundlage dieser Idee liegt annähernd 100 Jahre zurück. Bereits damals wurde von Coley der Gedanke geäußert, über eine gezielte Aktivierung des Immunsystems maligne Erkrankungen effektiv zu bekämpfen (COLEY et al., 1909). Zunehmende molekulargenetische Einblicke in die Tumorimmunologie erlauben es heute, wissenschaftliche Studien auf dieser Basis durchzuführen. Dabei konnte die Existenz zellulärer wie humoraler Immunreaktionen gegen Krebszellen bestätigt werden (LOTZE et al., 1990). Auf molekularer Ebene wurden dafür Tumorantigene und deren immundominante antigene Peptide (Epitope) als verantwortliche Induktoren identifiziert (TOWNSEND et al., 1989). Diese sind für die immunologische Interaktion zwischen Wirt und Tumor und damit für mögliche Therapiemodalitäten von grosser Bedeutung. Das wachsende Verständnis über den Vorgang der Antigenaufnahme und –präsentation rückt den Gedanken der Entwicklung und Anwendung unterschiedlicher immunologischer passiver wie aktiver Strategien

in immer greifbarere Nähe. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Konzepte hinsichtlich ihrer Spezifität, Realisierung und aktuellem therapeutischem Stellenwert.

**Unspezifische passive Strategien** sind beispielsweise die oft erfolgreiche aber ebenfalls nicht nebenwirkungsfreie Behandlung mit intravenöser Gabe von gentechnologisch hergestellten rekombinanten Immunmodulatoren (biological response modifiers BRM's) wie Interferon- $\alpha$  bei der Haarzellenleukämie (TROUSSARD et al., 1998) oder mit Interleukin-2 beim Nierenkarzinom.

Hingegen erhofft man mit **spezifischen Immunisierungen** eine gezieltere Immuntherapie zu erreichen. Die Grundlage hierfür bilden tumorspezifische und tumorassoziierte Antigene. Immunogen wirkt eine Tumorzelle dann, wenn sie auf ihrer Oberfläche in Verbindung mit MHC-Molekülen Peptidfragmente der Tumorantigene präsentiert (TROWSDALE et al., 1993). Diese induzieren zwar häufig nur eine schwache Immunabwehr, da sie in den seltensten Fällen Neoantigene darstellen und somit auch physiologisch in Normalgeweben exprimiert werden (Autoantigene) (OVERWIJK et al., 1999). Mittels verschiedener Strategien kann jedoch die natürliche Toleranz durchbrochen werden. Hierzu zählen unter anderem die Gabe monoklonaler Antikörper und Vakzinierungen auf Antigengrundlage. Zu den Tumorantigenen, die je nach Expressionseigenschaft und molekularer Charakteristik immunogen wirken, rechnen bislang vor allem virale Antigene, mutierte, überexprimierte, weit exprimierte Gene oder Differenzierungsantigene. Eine besondere Gruppe bilden dabei die **Cancer-Germline-Antigene** (CHEN et al., 1997), die außer in Testis-Normalgewebe spezifisch in einem Tumor oder einem Tumorspektrum exprimiert werden.

Bei **viralen Antigenen** kommt es zur Neoexpression eines viral kodierten Proteins. Dazu zählen z. B. Genprodukte von Epstein-Barr-Viren (EBV) (HENLE et al., 1974) oder Humanen Papilloma Viren (HPV Typ 16 Nucleoprotein E 7) (GISSMANN et al., 1984).

Die Epitope **mutierter Gene** wie dem Tumorsuppressorgen p53 (LEVINE et al., 1991) oder dem onkogenen P21ras-Protein (PEACE et al., 1993) werden nur spezifisch in Tumorgewebe exprimiert, so dass eine Immunantwort nur die Tumorzellen, nicht aber Normalgewebe betrifft. Solche individuellen krebsspezifischen Punktmutationen (JUNG et al., 1991), Deletionen oder Translokationen verändern die offenen Leseraster sonst ubiquitärer normaler Gene (WANG et al., 1998) und führen zur Expression veränderter Genprodukte (Epitope). Diese können sich auch von aberrant exprimierten intronischen Sequenzen ableiten (STOCKERT et al., 1998). Zur Klasse der mutierten oder aberrant exprimierten Antigene zählen z. B. CDK4 (WÖLFEL et al., 1995) und mutated HLA-A2 (RCC) (BRÄNDLE et al., 1996).

Wenn es sich um ein stark **überexprimiertes Gen** handelt (z.B. Her-2/neu beim Mammakarzinom (DISIS et al., 1994)), kann ebenfalls eine Immunantwort ausgelöst werden. Diese antigenen Epitope stammen häufig von normalen nichtmutierten Genen, deren Expression auf Tumoren und bestimmte Normalgewebe beschränkt ist (ROSENBERG et al., 1999) und die im Tumor überexprimiert werden. Dabei kommt es im Tumor zur Genamplifikation eines normalen Gens. Die erhöhte Präsentationsdichte des zugehörigen Peptids im Tumorgewebe führt aufgrund der hohen Dichte an Peptid-MHC-Komplexen zur Überschreitung der immunologischen Toleranzschwelle nur im Tumorgewebe, nicht jedoch im Normalgewebe zur Immunogenität.

SART-1 und PRAME zählen zu den **weit exprimierten Antigenen** (immunologisch aber selektiv), die sowohl ubiquitär in Normalgeweben, als auch in bestimmten Tumoren exprimiert (nicht überexprimiert!) werden. Jedoch werden nur die von Tumoren exprimierten Antigene von tumorinfiltrierenden Lymphozyten erkannt. Der Mechanismus ist weitgehend ungeklärt. So wird SART-1 in Lungen- und Ösophaguskarzinomen erkannt. Für das von PRAME codierte Protein konnte gezeigt werden, dass dieses nur dann von HLA-A24 restringierten T-Zellen, die einen NK-Zellen-Hemmungs-Rezeptor exprimieren, erkannt wird, wenn der Tumor sein HLA-Cw7-Klasse-I-Molekül verliert (VAN BAREN et al., 1998).

**Tumorspezifische Spleissvarianten** entstehen nach fehlerhaftem Spleissen und können konsekutiv als Mutationen in der proteinkodierenden Region resultieren.

Bei **Differenzierungsantigenen** resultiert eine Reexpression eines ansonsten „stillen“ Gens in Tumoren. Ein solches Gen wird sonst nur in der Ontogenese, also embryonal oder fetal auf normalen Zellen exprimiert. Im adulten Gewebe finden solche Antigene keine Immuntoleranz vor, wenn sie außerhalb immunprivilegierter Regionen (Auge, Testis, Gehirn, Uterus, Thymus) auftreten. Zu diesen Antigenen zählen die bekannten Melanozyten- bzw. Melanom-assoziierten-Antigene wie z. B. MAGE-1 (VAN DER BRUGGEN et al., 1991), Tyrosinase (BRICHARD et al., 1993), Gp 100 (BAKKER et al., 1994), gp 75 und Melan-A/MART-1 (KAWAKAMI et al., 1994). Die Expression von Differenzierungsantigenen in Netzhaut, Gehirn, Haut oder Innenohr schließen, wie bei Melanompatienten beobachtet, eine Immuntherapie grundsätzlich nicht aus, da in diesen Geweben kaum MHC-I-Moleküle exprimiert werden und diese deshalb oft nicht vom zellulären Immunsystem erkannt werden (BOEKELHEIDE et al., 1998). Antigene in diesen Bereichen lösen weder Toleranz noch Autoimmunität aus und können außerhalb dieser Regionen zum Ziel eines zellulären Immunangriffs werden, wenn sie auf MHC-I- oder MHC-II-Molekülen, beispielsweise auf einer

Tumorzelle, präsentiert werden. Die häufige genetische Instabilität mit Selektion nicht mehr antigenexprimierender Tumorzellsubklone schränkt die praktische Anwendung bei Differenzierungsantigenen ein (HERR et al., 1994).

**Cancer-Germline-Antigene**, denen in diesem Projekt unser vorrangiges Interesse galt, leiten sich von testispezifischen Transkripten ab und werden außer in Testis nur in Tumoren exprimiert. In Normalgewebe findet sich keine Expression. Die Cancer-Germline-Antigene, wie beispielsweise BAGE (BOEL et al., 1995); GAGE (DE BACKER et al., 1999), NY-ESO 1 (JÄGER et al., 2000) sind als **embryonale Antigene** normale Hodenproteine, deren Expression in Testisnormalgewebe eine immuntherapeutische Intervention nicht ausschließt (SAHIN et al., 1997), denn Testis zählt neben Gehirn, Auge und Uterus (Fetus) zu den **immunologisch privilegierten Geweberegionen** ohne MHC-Expression. Hodengewebe exprimiert zusätzlich eine große Anzahl von **CD-95-Liganden** (Fas-Liganden), die das Gewebe vor zytotoxischen T-Zellen schützen, da diese bei einer Bindung ihres CD-95-Rezeptors an den Fas-Liganden abgetötet werden (GREIL et al., 1998).

Einer der molekularen Regulationsmechanismen, die für das charakteristische Expressionsmuster der Cancer-Germline-Antigene verantwortlich sind, scheint mit der **genomweiten Hypomethylierung von DNA** bzw. der Demethylierung der Promotorregion zusammenzuhängen, die zur Reaktivierung dieser Gene in Tumoren führt (GARTLER et al., 1994). Weiter scheint die Expression mit zunehmender Dedifferenzierung assoziiert, wie Vergleiche der Expression von MAGE, BAGE und GAGE in primärem Melanom und metastasiertem Melanom nahelegen. Einzelne Cancer-Germline-Antigene werden bevorzugt in ganz bestimmten Dedifferenzierungsstadien exprimiert. So zeigten Vergleiche von NY-ESO-1 und Ctp 11, daß NY-ESO-1 in den metastasierten Melanomen exprimiert wird, Ctp 11 hingegen in den primären Melanomen auftritt (GOYDOS et al., 2001). Cancer-Germline-Antigene werden im Vergleich zu Differenzierungsantigenen wesentlich stabiler exprimiert und sind deshalb interessante Ziele für Vakzinierungsstrategien (JÄGER et al., 2000).

Das Spektrum der Cancer-Germline-Antigen-exprimierenden Tumorgewebe ist groß. So wurden Cancer-Germline-Antigene außer im Malignen Melanom (BOON et al., 1994) u. a. auch in Neuroblastomen (CHEUNG et al., 1997), Brustkrebs (JÄGER, E. et al., 1998), klarzelligen Nierenkarzinomen (TÜRECI et al., 1998), malignen hämatologischen Erkrankungen (SAHIN et al., 1998), Prostatakarzinomen, papillären Schilddrüsenkarzinomen (RUSCHENBURG et al., 1999), Synovial-Sarkomen, Blasenkarzinomen, Gliomen (SCARCELLA et al., 1999), Bronchialkarzinomen (LEE et al., 1999) und (SCANLAN et al., 2000), hepatozellulären

Karzinomen (STENNER-LIEWEN et al., 2000), im Ewingsarkom (LIU et al., 2000) und im Multiplen Myelom identifiziert (LIM et al., 2001). Einzelne Cancer-Germline-Antigene sind dabei vermutlich auf einzelne Neoplasien restringiert. Manche werden abhängig oder unabhängig coexprimiert. Die bis jetzt bekannten Cancer-Germline-Antigene kommen jedoch jeweils nur in einem begrenzten Tumorspektrum vor und werden auch nur jeweils in einem Bruchteil eines gegebenen Tumortyps exprimiert.

Die funktionelle Rolle der Cancer-Germline-Antigene ist meist unbekannt. Man vermutet sie im Zellzyklus, wie dies für das erste Cancer-Germline-Antigen mit bekannter Funktion zutrifft, dem aberrant exprimierten meiosespezifischen SCP-1-Antigen (synaptonemal complex protein 1), welches bei der Paarung der homologen Chromosomen beteiligt ist.

Gemeinsam ist den meisten bisher bekannten Cancer-Germline-Antigenen ihre Lokalisation auf dem X-Chromosom. Es gibt jedoch Ausnahmen wie SCP-1, das von HOM-TES-14 kodiert wird und auf Chromosom 1 lokalisiert ist (TÜRECI et al., 1998).

Die expandierende Anzahl identifizierter immunogener Cancer-Germline-Antigene in vielen Tumorentitäten prädestinieren diese als Ziel spezifischer Vakzinierungsstrategien. Das Prinzip soll im folgenden Abschnitt ansatzweise erörtert werden.

## **II.2. Spezifische Immuntherapie auf Antigengrundlage**

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts formulierte bereits Paul Ehrlich die Hypothese, dass eine spezifische Immuntherapie maligner Tumoren denkbar ist (EHRlich et al., 1900). Hierbei wird zwischen passiven und aktiven Strategien unterschieden.

### **Passive Immuntherapie**

Den Ausgangspunkt der spezifischen passiven Immuntherapie bilden zelluläre oder humorale Mechanismen mittels der Gabe **spezifischer Antikörper (humoral) oder Effektorzellen (zellulär)** gegen tumorassoziierte Antigene. Hier versucht man vor allem mit monoklonalen Antikörpern (KÖHLER et al., 1975) mit hoher Affinität zu tumorassoziierten Antigenen das Tumorwachstum zu kontrollieren (SAHIN et al., 1990) oder Killerzellen durch bispezifische Antikörper zu aktivieren, die in der Zielzelle Apoptose induzieren und eine Tumornekrose auslösen (RENNER et al., 1994; RENNER et al., 1997). So konnte zum Beispiel eine Induktion von Apoptose durch zytotoxische T-Zellen (CTL), die spezifisch für die Cancer-Germline-Antigene NY-ESO-1 und MAGE-3 waren, in Lungenkrebs und

Ösophaguskrebs erzielt werden (LEE et al., 1999).

Monoklonale Antikörper beeinflussen nach Bindung an die Tumorzelle Signaltransduktionswege, womit die Hemmung von Proliferationsreizen verbunden sein kann. Man versucht auch mittels einer komplementvermittelten (CDC) oder antikörpervermittelten (ADCC) Zelllyse oder über die Bildung anti-idiotypischer Antikörper Wachstumssignale zu blockieren und so eine Zellteilungshemmung zu erreichen (CLYNES et al., 2000). Mit individuell konstruierten anti-idiotypischen Antikörpern konnte erstmals 1982 bei einem Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom eine komplette Remission erzielt werden (MILLER et al., 1982). Verstärken lassen sich diese Effekte zusätzlich durch Kopplung an Immunotoxine, Zytostatika, Angiogeneseinhibitoren oder mittels eines Radionuklids (CIARDIELLO et al., 2000).

Auf dem Prinzip der Blockierung einer rezeptorabhängigen Signaltransduktion basiert auch der humanisierte monoklonale Antikörper Herceptin (Trastuzumab) beim HER2/neu überexprimierten Mammakarzinom (DISIS et al., 1994). Die Wirkung entfaltet sich dabei über eine Bindung des Antikörpers an das Transmembranantigen, dessen extrazellulärer Anteil Ähnlichkeiten zu EGF (epidermal growth factor) aufweist und dessen intrazellulärer Anteil Tyrosinkinase-Aktivität besitzt. Bei AK-Monotherapie wurden komplette Remissionen beschrieben (COBLEIGH et al., 1998). In Studien wurde zusätzlich eine synergistische Wirkung mit simultaner Chemotherapie (BASELGA et al., 1998) beschrieben. Dies führt man am ehesten auf eine kumulative Toxizität mit DNA-Schädigung und Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen zurück.

Die adjuvante Therapie fortgeschrittener kolorektaler Karzinome, Mammakarzinome und nicht kleinzelliger Lungenkarzinome (außer Plattenepithelkarzinome) mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab (CHEN et al., 2001) gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und der B-Zell-Lymphome (MALONEY et al., 1997) mit dem monoklonalen CD-20-Antikörper (Rituximab) folgen dem gleichen Wirkmechanismus.

Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz lymphokinaktivierter Killerzellen (LAK-Zellen) beispielsweise bei Nierenzellkarzinomen (RAVI et al., 1999) und beim Melanom (RICHARDS et al., 1999) oder antigenspezifisch geprägter tumorinfiltrierender Lymphozyten (aus Tumoren isolierte spezifische CTL, die in vitro mit IL-2 stimuliert und expandiert werden (TIL)) (BAKKER et al., 1994). Dabei verursacht IL-2 eine T-Zell-Aktivierung. Die Synthese von Antisense-Oligonucleotiden gegen die mRNA des bcr-abl-Gens bei CML und gegen das bcl-2-Gen bei follikulären Lymphomen sind weitere gentherapeutisch spezifische Ansätze.

## Aktive spezifische Immuntherapie

Das wesentliche Prinzip einer aktiven Immunisierung (Vakzinierung) besteht hingegen in einem wirksam präsentierten Antigen-Reiz. Auf der Basis dominanter gemeinsamer Tumorantigene soll eine spezifische Sensibilisierung des Patientenorganismus erreicht werden und konsekutiv eine spezifische Immunantwort (durch CTL und/oder ADCC) nach folgendem Prinzip induziert werden: Peptidfragmente der Tumorantigene (Epitope) im Komplex mit MHC-Molekülen werden dabei entweder von **zytotoxischen Effektorzellen (CD8+-Zellen)** (TOWNSEND et al., 1989) und/oder **T-Helferzell-vermittelt (CD-4+-Zellen) von lysierenden Antikörpern** erkannt (SWAIN et al., 1983; TROWSDALE et al., 1993). Die T-Zell-Aktivierung bzw. Immunantwort ist dabei neben dem Expressionsmuster und der Expressionsfrequenz vom Antigenprozessing dieser Antigene abhängig, die auf den MHC-Molekülen (Major Histocompatibility complex) der Klassen I und II präsentiert werden, in verschiedenen Differenzierungsstadien einer Tumorzelle. Sie differiert auch in **Abhängigkeit von MHC-Restriktion und dem exprimierten HLA-Haplotyp** (ROMERO et al., 1991). Manche Peptide werden nur von MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II-Molekülen gebunden und in einem stabilen Komplex an der Zelloberfläche CD8+-Zellen oder CD4+-Zellen präsentiert. Ob es konsekutiv zu einer T-oder B-Zell-Effektor-Antwort kommt, die die entsprechende Zielzelle zerstören können, hängt von der HLA-Restringenz der T-Zellen ab (VAN DEN EYNDE et al., 1997). Für die Auslösung einer Immunantwort sind ausserdem costimulierende Moleküle erforderlich, da bei deren Abwesenheit durch klonale Inaktivierung eine Immuntoleranz ausgelöst würde. Jedoch können auch unprozessierte zytoplasmatische oder nukleäre Tumorantigene, die nicht an der Oberfläche präsentiert, sondern sezerniert oder aus Tumorzelllyseprozessen freigesetzt werden, von antigenspezifischen membrangebundenen Immunglobulinen auf B-Zellen (mIg) gebunden werden. So werden kurze Peptidsequenzen, die lineare B-Zell-Epitope darstellen, unabhängig von der Sekundärstruktur des Antigens, z. B. korrekter Proteinfaltung, von Antikörpern erkannt. Zur Impfung benutzt man in erster Linie **Vakzine aus ganzen Tumorzellen, Peptidvakzine oder auf dendritischen Zellen basierende Vakzine**.

Eine **Vakzination mit nativen autologen Tumorzellen** oder in ihrer Antigenität durch Bestrahlung, Viren oder Gentherapie **modifizierten Tumorzellen** wurde schon mehrfach erprobt (BRASS et al., 1997; JÄGER, E. et al., 1998). Auch **mit Co-Stimuli** wie B7, GM-CSF und/oder Zytokinen **transfizierte Tumorzellen** kommen zum Einsatz (FEARON et al., 1999; VALMORI et al., 1999), um die Immunogenität der Vakzine zu verstärken. Eine molekulare Charakterisierung ist hierbei nicht erforderlich.

Als **Peptidvakzine** eignen sich Impfstoffe, die aus reinen antigenen Peptidfragmenten mit bekannter Aminosäuresequenz präpariert wurden und die spezifische Antworten in vitro erzeugen können. Diese werden intradermal appliziert oder auf antigenpräsentierende Zellen geladen. Dabei handelt es sich um Fragmente eines Genproduktes, welches durch ein definiertes Tumorantigen kodiert wird (FALK et al., 1990). Diese Fragmente können noch zusätzlich MHC-Klasse-I-spezifisch konstruiert werden, um entsprechend präsentiert werden zu können (SAHIN et al., 1998), was ihre Immunogenität erhöht. Klinische Studien, die solche aus Antigenen entwickelten Peptide nutzten, konnten mehrfach eine tumorspezifische CTL Induktion in vivo belegen. Das therapeutische Potential wurde erstmals bei Melanompatienten eindrucksvoll demonstriert (BAKKER et al., 1994). Auf der Grundlage von Cancer-„Testis“-Antigenen wie MAGE-3 und Differenzierungsantigenen wie Melan-A/MART-1, Tyrosinase und gp 100/Pmel 17 entwickelte rekombinante spezifische Impfstoffe (KAWAKAMI et al., 1997) zeigten bereits nach intradermaler Applikation klinische Erfolge mit passageren Tumorregressionen bei Melanompatienten (VAN DER BRUGGEN et al., 1991; HOON et al., 1995).

**Dendritische Zellen** (BAAR et al., 1999), die in lymphatischen Geweben gehäuft auftreten, exprimieren große Mengen an MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Molekülen sowie das costimulierende Molekül B7 und die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2, LFA-1 und LFA-3 (FALLARINO et al., 1999). Es überrascht nicht, dass sie starke Aktivatoren naiver T-Zellen sind. Durch Impfung mit Tumorantigen-transfizierten dendritischen Zellen bei Melanompatienten konnten spezifische CTL-Immunantworten induziert und Remissionen dokumentiert werden (NESTLE et al., 1999). Die Erfolge sind bisher allerdings nicht eindeutig. Eine Applikation autologer Tumorzellen kombiniert mit der Gabe potenter antigenpräsentierender dendritischer Zellen wird unter der Bezeichnung ASI-Therapie (aktive spezifische Immuntherapie) beim Kolonkarzinom (Stadium II und III) geprüft. Vorteil dieser Methoden ist die „sichere“ Beladung der professionellen antigenpräsentierenden Zellen, die in vivo nicht immer gewährleistet scheint. Diskutiert wird des Weiteren die Erzeugung rekombinanter Impfstoffe aus Antigen-kodierender DNA oder antigenpräsentierenden Zellen, die mit Genen transfiziert werden, die für tumorspezifische Antigene kodieren. Dies wurde verwirklicht mit einem Impfstoff, der aus mit dem muRas-Antigen (mutiertes p21 ras) transfizierten antigenpräsentierenden Zellen bestand. Statt dendritischer Zellen wurden hier EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinien (LCL) als antigenpräsentierende Zellen bei Patienten mit Pankreaskarzinom genutzt. Dabei ist es möglich, ohne Kostimulation mit B7-Zellen das tumorspezifische mutierte p21 ras-Protein auf



MHC-Klasse-I-Molekülen so zu präsentieren, dass eine CD8+-Antwort induziert wird (KUBUSCHOK et al., 2000). Aufgrund der meist monoklonalen Herkunft könnte die Ursprungszelle nach ihrer malignen Transformation von zytotoxischen T-Zellen oder spezifisch erkennenden Antikörpern vernichtet werden, bevor eine in vivo Selektion antigenloser Tumorzellvarianten erfolgt. Voraussetzung zur Realisierung dieser Strategien ist die präzise molekulare Definition möglichst vieler tumorspezifischer Antigene.

### II.3. Nachweismethoden für Cancer-Germline-Antigene

Verschiedene **Nachweismethoden** sind bisher bei der Suche nach immunogenen Tumorantigenen etabliert (ROSENBERG et al., 1999). Nachdem sich die Bemühungen in der Vergangenheit auf die Detektion tumorassoziierter Antigene mittels monoklonaler Antikörper sowie auf den Nachweis zirkulierender Immunkomplexe oder autologer Antikörper konzentrierten (PFREUNDSCHUH et al., 1978; OLD et al., 1981), waren im Zuge wachsender molekularer Erkenntnisse zunächst vor allem zwei Verfahren bekannt, immunogene Tumorantigene nachzuweisen und molekular zu definieren (VAN DER BRUGGEN et al., 1991; MANDELBOIM et al., 1994).

Dabei bildet die Erkennung antigener Peptide durch aus Patienten isolierte Klone **zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL)**, also durch zelluläre Immunreaktionen, die Grundlage für die angewendeten Verfahren, die auf **T-Zell-Reaktionen** basieren. Neben der Erkennung durch CD8+-Zellen sind auch Definitionen durch CD4+-Zellen beschrieben (TOPALIAN et al., 1992; BOON et al., 1994; COX et al., 1994; ).

Beim **genetischen Ansatz** der Arbeitsgruppe von T. BOON werden Plasmide einer Tumor-cDNA-Bank zusammen mit dem entsprechenden MHC-I-Gen in COS-Zellen transfiziert und auf Expression eines immunogenen Tumorantigens aufgrund ihrer Reaktion mit voretablierten zytotoxischen CD8+-T-Lymphozyten (CTL) überprüft (VAN DER BRUGGEN et al., 1991). Nach der Genidentifikation werden synthetische Oligopeptide hergestellt. Anschließend wird geprüft, ob diese durch die tumorspezifischen CTL-Klone erkannt werden. Solche in-vitro- Versuche konnten demonstrieren, dass synthetische Oligopeptide endogene Antigene imitieren können (BOON et al., 1994).

Beim **biochemischen Ansatz** werden Peptide, die an MHC-I-Moleküle von Tumorzellen gebunden sind, eluiert, durch HPLC (high-pressure liquid chromatography) fraktioniert und an MHC-I-Moleküle von Zellen gebunden, die unfähig zur Antigenprozessierung sind. Auch hier

erfolgt die Selektion über die Induktion einer Reaktion mit einem CTL-Klon (FALK et al., 1991; MANDELBOIM et al., 1994).

Diese zeitaufwändigen Methoden erfordern die Etablierung und Verwendung vorcharakterisierter CTL-Populationen, deren Reaktion mit dem Antigen wenig über die Bedeutung des Antigens im autologen Wirt aussagen.

Die folgende Aufstellung gibt einen Überblick über einige über den T-zellulären Ansatz definierten Tumorantigene:

**Tabelle 1. Identifikation von Tumorantigenen mittels CTL**

MAGE-1	(VAN DER BRUGGEN et al., 1991)
P53	(YANUCK et al., 1993)
mutated p21 ras	(PEACE et al., 1993)
MAGE-3	(GAUGLER et al., 1994)
BAGE	(BOEL et al., 1995)
GAGE-1	(VAN DEN EYNDE et al., 1997)
MAGE-4	(TAKAHASHI et al., 1995)
PRAME	(VAN BAREN et al., 1998)
RAGE-1 (RCC)	(NEUMANN et al., 1998)
LAGE-1	(LETHE et al., 1998)
CTp11	(ZENDMAN et al., 1999)
GAGE 2-6	(DE BACKER et al., 1999)

Eine dritte alternative Technik Tumorantigene zu identifizieren, die unabhängig ist von primären CTL und die Auseinandersetzung der humoralen Abwehr mit Tumorantigenen voraussetzt, nennt sich **SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning)**. Diese stellt bisher die einzige serologische Methode dar, Tumorantigene allein aufgrund ihrer Immunogenität und der dadurch hervorgerufenen autologen humoralen Immunantwort molekular zu identifizieren. Die Identifikation der Antigene ist dabei abhängig von einem hohen IgG-Titer im Patientenserum. Dies impliziert eine Interaktion von T-Helferzellen (CD4+-Zellen) mit dem

Antigen, da nur hierdurch eine lang wirkende Immunantwort mit Produktion und Sekretion von IgG- und IgA-Antikörpern möglich wird (PFREUNDSCHUH et al., 1978). Bei SEREX wird zuerst rekombinant exprimierte cDNA auf Reaktivität mit autologen Seren getestet. Nur immunogene positive Klone werden sequenziert und weiter charakterisiert. Als es mit SEREX gelungen war, mit Seren von Melanompatienten bekannte, ursprünglich durch CTL definierte MHC-1-restringierte Antigene (MAGE-1: HOM-MEL-55, Tyrosinase: HOM-MEL-45) humoral zu detektieren, war diese Methode validiert (SAHIN et al., 1995). Mit der SEREX-Methode konnten bisher mehr als 1800 Tumorantigene gefunden werden (PFREUNDSCHUH et al., 2000), gegen die eine humorale Immunantwort im Patienten erfolgt war und die sich in Abhängigkeit von Sequenzdaten, Expressionsprofil und Serologie verschiedenen Kategorien zuordnen lassen.

**Tabelle 2. Kategorien einiger über SEREX identifizierter Tumorantigene**

<b>Tumorantigen</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Referenz</b>
HOM-RCC-3.1.3. (CAH-like)	überexprimiert	(SAHIN et al., 1995)
HOM-HD-21 (lectin-like)	shared antigen	(CHEN et al., 1997)
HOM-Mel-40 (SSX-2-Gen)	Cancer-Germline-Antigen	(GÜRE et al., 1997)
HOM-Mel-55 (MAGE-1)	Cancer-„Testis“-Antigen	(TÜRECI et al., 1996)
Melan-A/MART-1	Differenzierungsantigen	(KAWAKAMI et al., 1994)
NY-ESO-1 gene family	Cancer-Germline-Antigen	(CHEN et al., 1997)
HOM-Glio-30.2.1. (TEGT-Gen)	überexprimiert	(TÜRECI et al., 1998)

Nachdem klar wurde, dass viele Tumorantigene Cancer-Germline-Antigene sind, entschloss man sich diese Tests auch gezielt mit testisspezifisch angereicherter cDNA oder subtraktiven Testis-cDNA-Banken durchzuführen, was u. a. zur Identifizierung von HOM-TES-14 (SCP-1) führte, welches außer in Testis noch in Gliomen und Brustkrebs exprimiert wird (TÜRECI et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit bilden weder die zelluläre noch die humorale Immunität den primären Ausgangspunkt für die Suche nach neuen Cancer-Germline-Antigenen, sondern der Sequenzdatenbankvergleich von Transkripten, die mit ihrer Testisspezifität ein obligates Kriterium erfüllen. Eine subtraktive Testis-Bank steht zu Beginn eines Sequenzierungsprojekts,

in dessen weiterem Verlauf erst Expressionsspektrum und Immunogenität untersucht werden.

#### **II.4. Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war die Suche nach neuen Cancer-Germline-Antigenen, die vor dem zuvor beschriebenen Hintergrund als Zielantigene der Entwicklung neuer polyvalenter Impfstoffe in der Antitumor-Therapie dienen könnten.

Aus einer **subtraktiven Testis-cDNA-Bank** sollten **neue testisspezifische Transkripte mit Expression in Tumoren identifiziert** werden. Dazu sollte eine Basischarakterisierung erfolgen, bei der zunächst eine **Sequenzierung** möglichst vieler differenter Klone erfolgt und die Sequenzen über eine Genbankanalyse auf Homologien überprüft werden. Aufgrund von Expressionsdaten sollten weitere Klone ausgewählt werden: Klone, die aufgrund dieses Vergleiches eine ubiquitäre Expression, Expression in Normalgeweben oder Expression in immunologisch bedeutsamen Geweben wie Thymus vermuten ließen, sollten von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden, ebenso bekannte vorcharakterisierte Transkripte. Für neue Klone oder Transkripte, die eine Homologie zur mRNA von Tumoren aufweisen, sollte im Anschluss eine **Expressionsanalyse** mittels RT-PCR und Northern Blot durchgeführt werden. Für den Fall einer tumorspezifischen Expression sollten für einen entsprechend exprimierten Klon die Gesamtlänge mittels RACE-PCR kloniert und ein offenes Leseraster bestimmt werden. Hieraus sollte das Translationsprodukt abgeleitet werden und dessen potentielle Funktion eruiert werden. Die chromosomale Lokalisation sollte bestimmt werden. Da die subtraktive Bank nur Plasmidklone beinhaltete und keine Expressionsbank darstellte, sollte eine **immunologische Charakterisierung** nur optional für einen aufgrund der Expressiondaten ausgewählten Klon erfolgen und sich nach dem Versuch der Herstellung des kodierten Proteins, auf die Überprüfung der Antikörperreaktion beschränken. Weitergehende Untersuchungen zur Immunogenität z. B. in Zellkultur sollten in einem gesonderten Projekt erfolgen und nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit sein.

### III. Material und Methoden

#### III.1. Material

##### III.1.1. Lösungen und Puffer

###### Blaumarker

- 0,25 % Bromphenolblau
- 0,25 % Xylencyanol
- 0,25 % Orange G
- 1mM EDTA
- 40 % Sucrose
  - in H<sub>2</sub>O dest lösen

###### Denhardt's Solution 100 x

- 2 % Polyvinylpyrid. (MG 400.000)
- 2 % Ficoll
- 2 % BSA
  - bei 37 ° C lösen und bei – 20 ° C lagern

###### DEPC-Lsg.

- 2 ml Diethylpyrocarbonat auf 1000 ml steriles H<sub>2</sub>O
  - über Nacht schütteln (Stufe 1,5) RT
  - autoklavieren

###### EDTA-Lsg pH 8,0

- 0,5 M 18,61 g/100 ml
- 0,1 M 3,72 g/100 ml
- 0,2 M 7,44 g/100 ml
  - mit NaOH-Plättchen auf pH 8,0 einstellen

###### GITC-Puffer

- 100,0 g Guanidiniisothiocyanat
- 107,0 ml DEPC-H<sub>2</sub>O
- 10,6 ml Tris/HCl (1,0 M pH 7,6)
- 10,6 ml EDTA-Lsg. (0,2 M pH 7,6)
- 21,2 ml N-Lauryl-Sarcosyl (20 g/l)

###### Hybridisierungslösung

- 100 ml Formamid
- 4 ml 100 x Denhardt's Solution
- 5 ml 20 % SDS
- 60 ml 20 x SSC
- 31 ml DEPC
- + Dextransulfat (10 g/l)

#### Laemmli-Laufpuffer

144,0 g Glycin

30,34 g Tris Base

10,0 g SDS

- ad 2000 ml H<sub>2</sub>O dest

#### Luria-Bertoni (LB) - Medium

10,0 g Trypton

5,0 g Yeast-Extrakt

10,0 g NaCl

- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest
- autoklavieren

#### LB-Agar

10,0 g Trypton

5,0 g Yeast-Extrakt

10,0 g NaCl

15,0 g Agar

- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest autoklavieren
- auf etwa 55 ° C abkühlen lassen
- in Petrischalen gießen

#### MOPS-Gel

113,0 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

1,5 g Agarose

- aufkochen
- abkühlen
- + 15 ml 10 x MOPS
- + 22 ml Formaldehyd 37 %

#### MOPS 10 x Stammlösung

41,8 g MOPS

6,8 g Na-Acetat

3,7 g EDTA

NaOH-Plätzchen

- pH 7,0 einstellen
- auf 1000 ml H<sub>2</sub>O-DEPC
- dunkel lagern

#### P1 + RNase (Boiling-Prep)

50 mM TrisHCl

10 mM EDTA pH 8,0

100 mg/ml RNase H

#### Prähybridisierungs-Lsg.

50% Formamid (50 ml)

2 X Denhardt's-Solution (4 ml 50 x)

0,1 % SDS (0,5 ml 20 %)

6 X SSC (30 ml 20 x)

- ad 100 ml H<sub>2</sub>O-DEPC

#### RNA-Laufpuffer

MASTERMIX für Blot	240 µl:
10 x MOPS	120 µl
Formamid	250 µl
Formaldehyd 37 %	175 µl
Blaumarker	50 µl
Ethidiumbromid	50 µl (20 µl bei präparativem Gel)
= MASTERMIX	645 µl

- pro Slot
- 15 µl MASTERMIX
- 14 µl DEPC
- 1 µl RNA

#### SDS 2 x Proteinprobenpuffer

0,6 ml Tris pH 6,0 1 M  
 2,5 ml Glycerol 100 %  
 2,0 ml SDS 10 %  
 0,5 ml Bromphenolblau 2 %  
 3,9 ml H<sub>2</sub>O dest

#### SSC 20 x

3,0 M NaCl = 175,3 g NaCl  
 0,3 M = 88,2 g Na-Citrat

- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O-DEPC
- pH 7,0

#### STETL-Lösung

- 8 g Sucrose  
 5 ml Triton-X-100  
 5 ml Tris-HCl 1,0 M pH 8,0  
 10 ml EDTA 0,5 M pH 8,0
- in 90 ml H<sub>2</sub>O lösen und bei 4° C lagern
  - steril filtrieren ad 100 ml H<sub>2</sub>O
  - vor Gebrauch + 0,5 mg/ml Lysozym 10 % (5 mg/ml Stocklösung bei –20 ° C)

#### TAE 50 x Stammlösung

242,0 g Tris Base  
 57,1 ml Eisessig  
 100,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O
- autoklavieren

#### TBE 10 x Licor

162,0 g Tris Base  
 27,5 g Borsäure  
 9,3 g EDTA

- pH 8,3 bei 50 ° C

- bei Raumtemperatur 2 Wochen haltbar

TBS 10 x Stammlösung

87,8 g NaCl

60,0 g TrisHCl

14,0 g Tris Base

- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest

TBS-T 10 x Stammlösung

1000 ml 10 x TBS + 5 ml Tween 20

TE 100 X

1,0 M Tris Base pH 8,0 = 121,10 g Tris Base

0,1 M EDTA = 37,22 g EDTA

- ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest



### III.1.2. Primer und Materialliste

Die Primer wurden jeweils über MWG-Biotech-AG, Ebersberg bezogen. Zur RACE-PCR wurden folgende Primer verwendet:

#### 1. Vektorspezifische Primer für pBK-CMV zur Klonierung aus dem Vektor

U 23 B	5'- TAG GGC GAA TTG GGT ACA CTT ACC TGG - 3'
U 27	5'- GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG - 3'
606	5'- TCG AAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG AAC - 3'
607	5'- ACA GCT ATG ACC TTG ATT ACG CCA AGC - 3'

#### 2. Sequenzspezifische Primer

Sub T 25-RC-AS 1	5' - TCC ACC TTT TGC TTG GAC TCA TGC ACC - 3'
Sub T 25-RC-AS 2	5' - AGG TCC TTC AAG GTT GTC TCT CGC TGG - 3'
Sub T 25-RC-S 1	5' - GCA AGA ACA TCG CAT CTG CGT CTG CGT - 3'
Sub T 25-RC-S2	5' - ACA ACC TTG AAG GAC CTG GAT ATC ATC - 3'
Sub T 39 RACE 1	5' - GAC AGG AAG CTG GCA GAA CGG AGG AGG - 3'
Sub T 39 RACE 2	5' - TCA GAC AAG TGT TTT GGA AAG AGC AC - 3'
Sub T 39 RACE 3	5' - GGC TTG ATT ACA AGC AAC AGA CAC - 3'
Sub T 39 RACE 4	5' - ATA GGC TCG CCC GTC GCG CGG CCG - 3'
Sub T 44 RACE 1	5' - AAG GGA CAT CTG TGC TTC CAG CTG AG - 3'
Sub T 44 RACE 2	5' - CGC CCG TCG CGC GGC CGC TGC CCT - 3'
Sub T 44 RACE 3	5' - GCC ACT CCA AGC TTG AGA TTT CTT TC - 3'
Sub T 44 RACE 4	5' - ATC ATC ACT GCA GAC CTC GAC CCT TCT G - 3'

#### 3. Primer für RT-PCR

Sub T 17 S 1	5' - GCA GGA GCA CTT CAA AGT ATG - 3'
Sub T 17 R 1	5' - GGT ACC CGT AGT GCC CAG CAT CCA - 3'
Sub T 32 TAR-AS	5' - AGA GTG AGA TTC TGT CTC AAA ATA - 3'
Sub T 32 TAU	5'- CCG AAA CAC CAA GTG AGG CCA TAG - 3'
Sub T 32 TAR	5'- CAG CAG CTC CAG CTG GTC CAC GTC - 3'
Sub T 36 S	5'- GAA GTT TAG GGC AAG CTT CGC CTC - 3'
Sub T 36 AS	5'- TAT ACC CCT ATA CGC GTT TAA GGA - 3'
Sub T 44 TAR-S	5'- TTA TGT GTC CAT TTC ATT TCT ATT - 3'
Sub T 44 TAR-AS	5'- AGG ACC TGC ATC AGC TGA AGA GAG - 3'
Sub T 44-S-W56462	5'- AAT GCA TTG TGC AGT GGT TAA AGA - 3'
Sub T 44 TAR-AS korrr.	5'- AGG AAC TGC ATC AGC TGA AGA GAG - 3'
Sub T 50 TAR-S	5'- ACC TCA GCC ATC AGA TGT TCC TGA - 3'
Sub T 50 TAR-AS	5'- GAC AGA GTG AGA TTC TGT CTC AAA - 3'

Sub T 55 TAR-S	5'- CCT CAG CCA TCA GAT GTT CCT GAA - 3'
Sub T 55 TAU-S	5'- CAT GAG TTG CCG CCG AGA AGC CGA - 3'
RACE 985 S 1	5'- AGC GCT CCC TGA TAC CTC CAT CAC - 3'
RACE 985 S 2	5'- CTC CCT GAA TCC CCA TGT CTC TCG - 3'
RACE 985 AS 1	5'- GGC TCC AGG ACT GAG ATC TTG CTG - 3'
RACE 985 AS 2	5'- GGC CTT CAA AGG TTG TCT CTC GCT - 3'

#### 4. Primer zur Amplifikation des proteinkodierenden Bereiches von sub T 25 / Volllänge aus Testis-cDNA zur Ligation in pQE :

Kin. Like sense-Sac	5'- GGG AGC TCA TGG CCA GCC AGT TCT GC - 3'
Kin. Like as-Hind	5'- GGA AGC TTC TAA CAG AGT GGG TAA TG - 3'

#### 5. Sonstige Materialien:

Amersham Buchler GmbH, Braunschweig:

Nitrocellulose-Membranen  
Hybond N  
Röntgenfilmmexpositions-kassette mit Verstärkerfolie  
UV-Geräte, Sicherheitsausrüstung  
Transilluminatoren (Crosslinker)

Applied Biosystems (P. E. Perkin Elmer), Weiterstadt:

Taq-DNA-Polymerase AmpliTaq

Biometra:

Thermocycler (PCR-Maschinen)

Biomol, Hamburg:

Isopropylthiogalactosid (IPTG)

5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-D-Galactopyranosid (X-GAL)

Bio-Rad Laboratories GmbH, München:

Anti-6xHis-tag-IgG

Ammoniumpersulfat (APS)

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Restriktionsenzyme: EcoRI

HaeIII

HindIII

PvuII

SacI

Taq-DNA-Polymerase

Clontech GmbH, Heidelberg:

ExpressHyb Hybridization Solution

Dianova, Heidelberg:

Maus-Anti-human-IgG-Fc-AP-konjugiert

Rabbit-Anti-Maus-IgG

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Yeast-Extract

Epicentre Technologies (über Biozym, Hessisch Oldendorf):

Sequagel-Kit LC, Sequagel XR-Kit, Sequagel complete buffer

SequiTherm EXCEL TM II Long-Read TM DNA Sequencing

Kit-LC

Fluxa Chemie, Buchs, Schweiz:

Guanidiniumthiocyanat, Natriumlaurylsarkoniat  
 ICN Biochemicals GmbH, Eschwege:  
 $\alpha$ -32 P dCTP 250  $\mu$ CI (25  $\mu$ l)  
 Invitrogen BV, NV Leek, Niederlande:  
 Topo-TA Cloning Kit  
 TA-Reverse-Primer, TA-Universe-Primer  
 Life Technologies GmbH (Gibco-BRL), Eggenstein:  
 Reverse Transkriptase Superscript RT  
 Merck, Darmstadt:  
 Ammoniumacetat  
 Acrylamid  
 $\beta$ -Mercaptoethanol  
 Borsäure p. A.  
 Chloroform p. A.  
 Dextransulfat  
 Dimethylsulfoxid (DMSO)  
 Ethylendiamintetraacetat (EDTA)  
 Natriumdodecylsulfat (SDS)  
 Molecular Dynamics, Freiburg :  
 Phosphor Imager  
 MWG-Biotech-GmbH, Ebersberg:  
 LICOR 4000 L  
 Primer, Oligonukleotide  
 Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg:  
 Amicon-Säulen  
 dNTP-Set  
 Ficoll 400  
 Nick-Säulen Sephadex G-50  
 Restriktionsendonukleasen  
 RTG (ready to go) DNA-Labeling Kit  
 Qiagen GmbH, Hilden:  
 QiaExpress Expressionssystem Vektor pQE-30  
 Qiagen Plasmid Kits  
 Qiaex Kit  
 Schleicher und Schüll, Dassel:  
 Nitrocellulose  
 Sigma, St. Louis:  
 Agarose  
 Ampicillin  
 Bovines Serumalbumin (BSA)  
 Bromphenolblau  
 Ethidiumbromid  
 Kanamycin  
 MOPS  
 N-Lauroylsarcosin  
 Sucrose  
 Trishydrochlorid (TrisHCl)  
 Trishydroxymethylaminoethan (Tris Base)  
 Stratagene GmbH, Heidelberg:  
 Phagemid-Vektor pBK-CMV

## **III.2. Methoden und Protokolle**

### **III.2.1. Subtraktive Testis-Bank, In-vivo-Exzision und Subklonierung**

Bei einer subtraktiven Testis-Bank handelt es sich um eine Bank, die für selektiv in humanem testikulären Gewebe exprimierte Antigene angereichert ist.

Die vorliegende subtraktive Bank wurde von Dr. Ugur Sahin nach den Protokollen aus MANIATIS et al., 1982 und DIATCHENKO et al., 1996 hergestellt und mir zur Verfügung gestellt. Für die Konstruktion wurde dabei eine modifizierte Technik als Abwandlung der von DIATCHENKO et al., 1996 beschriebenen SSH-Technik (suppression subtractive hybridization) angewandt (TÜRECI et al., 1998): Für die Konstruktion testisspezifischer DNA wurden 2 µg mRNA, die aus zwei verschiedenen Testis-Geweben isoliert wurde, als Tester benutzt. Die „driver“-cDNA wurde von mRNA synthetisiert, die aus 10 Normalgeweben extrahiert wurde. Für den spezifisch angereicherten cDNA-Pool dienten so Testis als „tester“ und 10 verschiedene Normalgewebe als „driver“. Die Normalgewebe waren dabei: 1. Leber 2. Lunge 3. Haut 4. Muskel 5. aktivierte periphere Blutmonozyten 6. Niere 7. Gehirn 8. Magen 9. Colon und 10. ruhende Lymphozyten. Testisspezifische cDNA wurde in das Phagemid pBK-CMV (STRATAGENE) kloniert. PBK-CMV besitzt u. a. eine multiple Klonierungsstelle sowie definierte Restriktionsenzym-Schnittstellen. Aufgrund definierter „priming sites“ ist es retrospektiv möglich, die Gesamtlänge ansequenzierter Fragmente mittels RACE-PCR aus dem Vektor heraus zu bestimmen und die erhaltenen Amplifikationen zu sequenzieren.

#### **III.2.1.1. Ligation**

Die Ligation ist eine Methode, DNA-Stücke mit Hilfe von Enzymen, zum Beispiel dem Enzym Ligase, zu verknüpfen. Bei der Ligation der Fragmente mit dem TOPO-TA-Cloning-Kit wird statt einer Ligase ein mit Topoisomerase I „aktivierter“ Vektor verwendet. Die Reaktion ist nach 5 min beendet und damit deutlich schneller als eine übliche T4-Ligase-Reaktion. Der TOPO-TA-Cloning-Kit ist speziell konfiguriert, um Taq-amplifizierte PCR-Produkte mit einer Effizienz von ca. 95 % in den pCR-2.1 TOPO-Vektor mit kovalent gebundener Topoisomerase I zu klonieren. Er besitzt 3'-T-Überhänge für die direkte Ligation. Das PCR-Produkt wird von EcoRI-sites flankiert, die eine spätere leichte Exzision des Inserts ermöglichen. Es sind noch weitere definierte Schnittstellen enthalten. PCR 2.1-TOPO ist 3.9 kb lang und besitzt ebenfalls eine „multiple cloning site“ (MCS), in deren Bereich ein  $\beta$ -Galaktosidase-Gen enthalten ist, zur

Bestimmung des Anteils rekombinanter Klone mittels „Blue-White“-Test, ein Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion, sowie beidseits der Klonierungsstelle „priming sites“ mit EcoRI-Sites für die Primer TA-Universe und TA-Reverse, von denen ausgehend beide Stränge des Inserts sequenziert werden können.

Die Ligation der aus der Testis-Bank amplifizierten Fragmente erfolgte in Topo-TA-Vektoren (INVITROGEN). Die Ligation wurde wie folgt durchgeführt:

Ligationsansatz:

1,0 µl Puffer

0,5 µl TOPO-TA-Vektor (mit Topoisomerase I aktivierter Vektor)

0,5 µl H<sub>2</sub>O

Es wurden 1 µl PCR-Produkt zu 2 µl Ligationsansatz gegeben und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert.

### **III.2.1.2. Transformation**

Die Transformation ist eine Methode, um Plasmide in Bakterien einzuschleusen. *E. coli* Bakterien, die mit kaltem Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) behandelt und anschließend kurz erwärmt werden, sind in der Lage Plasmid-DNA aufzunehmen (MANDEL et al., 1970). Auf diese Weise gelingt es Plasmide in prokaryontische Zellen einzuschleusen und durch Expansion des entsprechenden Bakterienklons massiv zu vermehren.

Dazu wurden 100 µl kompetente Bakterien *E. coli* DH 5 alpha mit 1-3 µg Ligationsansatz oder Plasmid 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach einminütiger Erwärmung bei 42 ° C und direkter Abkühlung (auf Eis) wurde 450 µl LB-Medium hinzugegeben und 1h bei 37 ° C geschüttelt. 100-300 µl des Ansatzes wurden auf Agarplatten mit Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37 ° C inkubiert. Zur Überprüfung der Ligationseffizienz wurde ein Blue-White-Test durchgeführt:

Ist eine Klonierung einer cDNA in die entsprechende MCS erfolgt, so wird das β-Galactosidasegen unterbrochen und keine funktionsfähige β-Galactosidase mehr gebildet. Man kann deshalb durch Verwendung des farblosen Substrates X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid), welches in Anwesenheit der β-Galactosidase zum blauen 5,5-Dibrom-4,4-dichlorindigo umgesetzt wird, den Anteil rekombinanter Klone als

Maß für die Güte der Ligation bestimmen. Der Anteil der weißen Kolonien an der Gesamtzahl der auf der Platte aufgewachsenen Klone ist Ausdruck der Ligationseffizienz („Blue-White-Test“) (ULLMANN et al., 1970).

### **III.2.1.3. Bakterienkultur**

Die Bakterienkultur dient der Vermehrung der insertpositiven Klone.

Von den Agarplatten wurden einzelne weisse Kolonien steril gepickt und in einem Aliquot LB-Medium mit Ampicillin zur Selektion über Nacht bei 37 ° C unter Schütteln inkubiert.

### **III.2.1.4. Glycerolstocks**

Durch das Anfertigen von Glycerolstocks ist es möglich, einzelne native Bakterien, aber auch Bakterientransfektanten, die ein bestimmtes Insert enthalten, über mehrere Jahre zu lagern.

Um auch später wieder Untersuchungen vornehmen zu können, wurden von allen 55 Klonen Glycerolstocks angefertigt. Hierzu wurde ein Aliquot einer frischen Bakterienkultur mit 40 Vol % Glycerol versetzt und dann bei – 80 ° C weggefroren.

### **III.2.1.5. Plasmidpräparation**

Die verschiedenen Verfahren der Plasmid-Präparationen dienen dazu, die Plasmid-DNA ohne Anteile von RNA oder chromosomaler DNA aus den Bakterien zu isolieren und sie so für die weiteren Verfahren wie Restriktionsenzymverdau, PCR oder Sequenzierung zur Verfügung zu haben. Dabei unterscheiden sich die Präparationen in Ausbeute und Reinheit der gewonnenen Plasmid-DNA.

#### **III.2.1.5.1. STETL-Mini**

Die Plasmid-Mini-Boiling-Präparation ist eine schnelle Methode mit einer hohen Ausbeute, bei der jedoch die erhaltene Plasmid-DNA eine geringe Reinheit aufweist und deshalb für die Sequenzierung nur bedingt geeignet ist. Hier werden durch Einsatz von SDS und Lysozym Zellmembranen und Proteine hydrolysiert und hochgenomische DNA unter alkalischen

Bedingungen hitzedenaturiert (BIRNBOIM et al., 1979)

Einzelne Bakterienkolonien, die je mit einem das gewünschte Insert tragenden Konstrukt transformiert waren, wurden über Nacht in 3 ml LB-Selektionsmedium bei 37 ° C auf einem Schüttler kultiviert. Die Bakterien wurden bei 8000 rpm/3 min pelletiert, in 200 µl STETL-Lösung resuspendiert und anschließend 30 sec im Wasserbad gekocht. Nach Abschrecken auf Eis wurden Proteine, Zelldetritus und die hochgenomische DNA bei 4 ° C/12000 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert, das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und aus dem verbliebenen Überstand durch Zugabe von 200 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation bei RT/12000 rpm/15 min die Plasmide gefällt. Nach Waschen des Pellets mit 70 % igem Ethanol und vollständigem Trocknen erfolgte eine Aufnahme desselben in 20 µl P1 + RNase. Die Konzentration der so erhaltenen Plasmid-Präparation konnte dann photometrisch bestimmt werden.

#### **III.2.1.5.2. Spin Plasmid Mini nach Qiagen**

Die Methode der Plasmid-Mini-Präparation nach QIAGEN ist zwar in der Ausbeute dem oben geschilderten Verfahren unterlegen, liefert dafür aber hochreine, nicht alkalisch denaturierte und damit gut sequenzierfähige Plasmid-DNA (BIRNBOIM et al., 1979). Die Lyse der Bakterien erfolgt in einem alkalischen SDS-haltigen Puffer P2 unter Anwesenheit von RNase (Puffer P1). SDS solubilisiert Phospholipide und Proteine der Zellmembran und führt dadurch zur Freisetzung der Zellbestandteile. NaOH denaturiert sowohl Proteine und hochgenomische DNA als auch die Plasmid-DNA. RNase führt zur Zerstörung der freiwerdenden RNA. Bei genauem Einhalten der kritischen Lysezeit kommt es bei Neutralisierung mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration (Puffer P3) zur Ausbildung von Präzipitaten aus SDS, denaturiertem Protein, hochgenomischer DNA und Zelldebris, wobei die korrekt renaturierte Plasmid-DNA in Lösung verbleibt und nach Zentrifugation als Überstand abgenommen werden kann. Eine Aufreinigung des Überstandes erfolgt dann über eine nur die Plasmid-DNA bindende voräquilibrierte (Puffer QBT) Säulenmatrix, wobei Reste von RNA und Proteinen mit einem Waschpuffer QC ausgewaschen werden. Die mit Puffer QF eluierte Plasmid-DNA wird dann mit Isopropanol gefällt, mit 70 % igem Ethanol gewaschen, nach Luftrocknung in TE-Puffer aufgenommen und kann dann zur Sequenzierung verwendet werden.

1,5 ml einer Bakterienkultur wurden 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Dann wurden 300 µl P1 + RNase ( kalt ) hinzugegeben und das

Bakterienpellet gelöst. Anschließend 300 µl P2 ( RT ) hinzugefügt und gemischt, bis eine klare Lösung entstand. Nach einer Inkubationszeit von max. 5 min bei RT wurden 300 µl P3 ( kalt ) dazupipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 20 min bei max. rpm bei 4 ° C ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand in neue Eppis überführt. Anschliessend wurde nochmals 5 min bei max. rpm und 4 ° C zentrifugiert. Währenddessen wurden die Säulen vorbereitet und mit 1 ml Equilibrationspuffer (QBT) ganz durchgespült und dann die Probe hinzugegeben. Im Anschluss wurde mit 2 x 2 ml Waschpuffer (QC) durchgespült. Die nächste Spülung erfolgte mit 800 µl Elutionspuffer (QE) in ein neues Falcon. Das Eluat wurde auf Eppis verteilt und mit Isopropanol gefällt. Nach einer Inkubationszeit von 10-30 min bei RT wurde nochmals 30 min bei RT zentrifugiert, der Überstand in neue Eppis verteilt. Nach Ethanolzugabe wurde nochmals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das mit 75 % Ethanol gewaschene Pellet wurde getrocknet und dann in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **III.2.2. Insertanalyse**

#### **III.2.2.1. Restriktionsenzymspaltung**

Der Restriktionsenzymverdau der Konstrukte ermöglicht die Längenbestimmung des in die MCS des Topo-TA-Vektors klonierten Inserts. Dazu werden Restriktionsenzyme verwendet, die jeweils nur einmal auf beiden Seiten des Inserts in der MCS des Plasmids, in die das Insert ligiert wurde, schneiden. Man erhält so, sofern keine interne Schnittstelle im Insert vorliegt, beim Auftragen auf ein Agarosegel eine Bande, die dem Plasmid entspricht und eine zweite, die das Insert darstellt. Über einen mitlaufenden Längenmarker ist dann eine Längenbestimmung der Fragmente möglich. Enthält das Insert interne Schnittstellen, erhält man mehrere Fragmente. Zusätzlich läßt sich über die Verwendung mehrerer Enzyme eine Kartierung des Inserts durchführen, die es später ermöglicht, optimal große Fragmente, zum Beispiel für die Herstellung einer Sonde, aus dem Insert herauszuschneiden. Zur Durchführung eines Verdaus setzt man in einem geeigneten Volumen (20-50 µl) Wasser, die zu verdauende Menge DNA mit dem zum Restriktionsenzym passenden Puffer an. Die optimale Funktionsfähigkeit des jeweiligen Restriktionsenzym erreicht man dabei bei einer Konzentration von 1-2 U Enzym pro µg DNA bei Verwendung des jeweils optimalen Puffers.

Zunächst wurde für beispielsweise 10 Proben ein Mastermix angesetzt, der pro Probe (19 µl Mastermix) je 2 µl Puffer (1:10) z. b. TX-100-orange, 0,2 µl BSA (1:100), 0,5 µl Enzym (5 U)



EcoRI und 16,3 µl H<sub>2</sub>O enthält. Dann wurde 1 µl der über die Minipräps erhaltenen Plasmid-DNA hinzugegeben, so daß das Gesamtvolumen 20 µl betrug. Anschließend erfolgte der Verdau bei 37 ° C für 1,5-2,5 Stunden (je nach DNA-Menge). Im Anschluss konnten die 20 µl-Proben elektrophoretisch analysiert werden.

### **III.2.2.2. Analytische Agarose-Gel-Elektrophorese**

Bei der Agarosegelelektrophorese wandern negativ geladene Nukleinsäurefragmente größenabhängig unterschiedlich weit im elektrischen Feld. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid (EtBr), einer sequenzunspezifisch an Nukleinsäuren interkalierenden Substanz, die bei Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 300 \text{ nm}$ ) Licht der Wellenlänge 590 nm emittiert, können die Nukleinsäuren sichtbar gemacht und bezüglich Reinheit, Größe und Konzentration beurteilt werden durch Vergleich mit einem definierten Längenstandard (ALPHEY et al., 1995).

Für DNA-Gele (Agarose-Gel 2,0 %) wurden 150 ml 1 x TAE-Puffer mit 1g - 3g Agarose gekocht, nach Abkühlung auf etwa 60 ° C mit 75 µl Ethidiumbromid versetzt und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE-Puffer eingesetzt. Zur Elektrophorese wurden die Gele pro Slot mit ca. 20 µl DNA-Proben, denen nach Verdau noch 1 µl Blaumarker und Ladepuffer zugegeben worden war, beladen und die Nukleinsäuren bei 80-100 V in der Elektrophoresekommer aufgetrennt. In einen Slot wurden 1-2 µl des Längenstandards  $\lambda$ -DNA Eco47I mit Blaumarker pipettiert.

### **III.2.2.3. Sequenzierung**

#### **III.2.2.3.1. Sanger-Sequenzierung**

Die Sequenzierung der 55 Klone erfolgte nach der Didesoxynukleotidmethode, die erstmals von Sanger (SANGER et al., 1977) beschrieben wurde.

Diese Methode basiert darauf, dass 2', 3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) zwar über ihre 5'-Triphosphatgruppe in eine neue Nukleinsäurekette eingebaut werden können, eine weitere Verlängerung der Kette jedoch aufgrund des Fehlens der OH-Gruppe in 3'-Position der Desoxyribose nicht möglich ist und es so zum Kettenabbruch kommt („Stopnukleotide“). Erstellt man nun einen Reaktionsansatz aus zu sequenzierendem Template, Primer, DNA-Polymerase, ddNTPs und Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs), kommt es bei einer geeigneten Temperatur

zunächst zur Anlagerung des Primers an die komplementäre Region des Templates („Annealing“). Anschließend erfolgt durch die DNA-Polymerase ein Anbau von dNTPs am 3'-Ende des Primers mit Verlängerung der Kette; bei Einbau eines ddNTPs kommt es jedoch zum Kettenabbruch. Über das Verhältnis von ddNTPs zu dNTPs kann man die Wahrscheinlichkeit des Abbruchs einer in der Verlängerung befindlichen Kette beeinflussen. Man erhält deshalb durch exakte Einhaltung eines definierten Verhältnisses von dNTPs zu ddNTPs am Ende der Reaktion ein Gemisch aus vielen verschiedenen Oligonukleotiden, die sich in ihrer Länge jeweils um genau eine Base unterscheiden, da für jede Position dieselbe Wahrscheinlichkeit eines Kettenabbruches besteht. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer lässt sich dann, nach Auftrennung des Reaktionsgemisches in einer hochauflösenden Gelelektrophorese, die genaue Nukleinsäuresequenz ermitteln.

Alle Sequenzreaktionen wurden mit dem Sequitherm Excel Long-Read LC-Kit durchgeführt. Die Klone wurden mit vektorspezifischen Primern TAR und TAU sequenziert. Zur Durchführung der Sequenzreaktion wurden zunächst 2 µl der vier verschiedenen ddNTPs (G, A, T, C) auf Reaktionsgefäße verteilt. Ein Mastermix aus 1 µg Template, 2 pmol Primer, 5 µl 5 x Puffer BA, 2,5 µl 10 x Puffer BB und 1 µl Polymerase wurde mit bidestilliertem Wasser auf 17 µl aufgefüllt. Jeweils 4 µl dieses Mixes wurden zu den verschiedenen Stopnukleotiden gegeben, mit einem Tropfen Paraffin überschichtet, um das Verdampfen zu verhindern, und in einem Thermocycler folgende Sequenzreaktion durchgeführt:

1. 94 ° C/2 min (Denaturierung)
2. 55-70 ° C/1 min (Annealing; Temperatur abhängig von GC-Gehalt des Primers)
3. 70 ° C/1 min (Elongation)
4. 94 ° C/1 min (Denaturierung)
5. Schleife von 4 an 2; 30 Zyklen
6. 4 ° C/∞

Jede Reaktion wurde mit 3 µl Stopppuffer gestoppt und das Reaktionsgemisch nach einer erneuten Denaturierung (70 ° C/5 min) auf ein denaturierendes Elektrophoresegel aufgetragen.

### **III.2.2.3.2. Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese**

Zur Herstellung des hochauflösenden Polyacrylamidgels wurde der Sequagel-XR-Kit für ein 0,25

mm dickes Gel verwendet. Der Einsatz von DMSO erleichtert die Trennung und verhindert eine Renaturierung. Die Auswertung des Polyacrylamidgels wurde mit dem LICOR-Sequenzierer unter Verwendung der LICOR-Software durchgeführt und abgespeichert. Der LICOR-Sequenzierer erkennt markierte DNA-Moleküle, die vom Laser am Ende der Trennstrecke angeregt werden. Das LICOR 4000 L System liefert pro Probe über 800 Basen mit einer Genauigkeit von 99 % (MIDDENDORF, L. R. et al., 1992).

Dazu wurden 30 ml Sequagel XR, 7,5 ml Sequagel complete buffer und 400 µl DMSO zusammenpipettiert, durch einen Papierfilter filtriert und anschließend mit 300 µl Ammoniumpersulfat (APS) versetzt. Diese Lösung wurde luftblasenfrei zwischen 2 vorbereitete Gelträgerglasplatten gegossen und am oberen Ende ein Gelkamm eingefügt. Nach Auspolymerisieren wurde dieser entfernt und die Glasplatte im LICOR eingespannt. Die Slots wurden mit jeweils 1 µl der verschiedenen Reaktionsansätze beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 1500 V/50 W in TBE-Laufpuffer über 8-10 Stunden im Sequenzierapparat (LICOR DNA 4000 L).

#### **III.2.2.4. Sequenzvergleich und Datenbankrecherche**

##### **III.2.2.4.1. Homologievergleich über DNASIS**

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Softwareprogrammen DNASIS und PROSIS (PHARMACIA BIOTECHNOLOGIE) bearbeitet.

##### **III.2.2.4.2. Datenbankanalyse über BLAST SEARCH, Genbank und Unigene**

Die Sequenzvergleiche wurden über im Internet vorhandener Software (Blast Search am NCBI (ALTSCHUL et al., 1991), FASTA, Stanford, USA) mit DNA-Datenbanken durchgeführt:

- European Molecular Biology Laboratory: EMBL, Cambridge, Grossbritannien (EMMERT et al., 1994)
- GenBank am National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA ( BENSON et al., 1994)
- DNA Databank of Japan: DDBJ

Datenbankvergleichen von Proteinsequenzen dienten außer SWISS-PROT (EMMERT et al.,

1994), PROSITE (BAIROCH et al., 1997) und Pfam noch TREMBL (ALPHEY et al., 1995). SWISS-PROT enthält gut überprüfte und kommentierte Daten aus der EMBL-Datenbank.

Die Sequenzanalyse über Blast Search beinhaltete für jeden sequenzierten Klon Homologie-Abgleiche auf

- a) mRNA-Ebene oder Transkriptebene über blast n/nr
- b) Proteinebene oder Translationebene über blast x/nr
- c) mRNA-Vergleiche über blast n/dbest mit Sequenzen, die aus verschiedenen prokaryontischen und eukaryontischen Organismen und Geweben (Normal- oder Tumor-) isoliert worden waren und die bis dato oft nicht oder unvollständig charakterisiert waren.

### **III.2.3. Expressionsanalyse ausgewählter cDNAs**

Zur Charakterisierung der Klone auf Transkriptebene wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt: RT-PCR und Hybridisierungen per Northern Blot. Dazu war zunächst die Isolierung von RNA notwendige Voraussetzung.

#### **III.2.3.1 RNA-Isolierung**

RNA wurde isoliert aus Normal- und Tumorgeweben, die von der Pathologie der Klinik Bamberg oder von den Universitätskliniken Homburg zur Verfügung gestellt wurden. Einige Gewebe wie Bronchialkarzinome und Gliome wurden von der Homburger Neurochirurgie und Herz-Thorax-Chirurgie zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben wurden bei diagnostischen oder therapeutischen Interventionen gewonnen. Nach Absprache mit der Pathologie in Bamberg wurde ein Anteil der frisch entnommenen Proben sofort tiefgekühlt, um die RNA nicht durch enzymatischen Abbau zu gefährden. Die Proben wurden bei – 80 ° C aufbewahrt. Jede Probe läßt sich anhand der Essentials einem Patienten mit Diagnose zuordnen. Die klinischen und histologischen Befunde wurden freundlicherweise auf Anfrage von der Pathologie Bamberg übermittelt. Zellen, in diesem Fall diverse PBMC, wurden mir in Form von 5 Aliquots von Dr. Frank Neumann zur RNA-Isolierung überlassen. Aus den positiven RNA-Proben wurde teilweise cDNA hergestellt. Alle positiven und integren RNA-Proben wurden zur Northern-Blot-Herstellung verwendet.

Bei der RNA-Extraktion wurde die von CHOMCZYNSKI und SACCHI 1987 erstmals beschriebene Guanidiumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode (CHOMCZYNSKI et al., 1987) angewandt. Die Trennung der RNA von den übrigen Zellbestandteilen erfolgt dabei mit Hilfe

einer Phenol/Chloroform-Extraktion, bei der Proteine und hochgenomische DNA ausfallen und die RNA als wässrige Oberphase abgenommen werden kann. Eine Limitation bei der Arbeit mit RNA ist die hohe Anfälligkeit gegenüber endogenen und exogenen RNAsen. Zur Inaktivierung von RNAsen beziehungsweise Kontaminationsprophylaxe sind deshalb eine Reihe von Maßnahmen notwendig, wie die Verwendung von sterilen Glasgefäßen und Metallgegenständen, steriler Plastikware, Lagerung von RNA und Geweben bei - 80 ° C, Arbeiten unter einem Abzug, sowie die Behandlung aller im Umgang mit der RNA eingesetzten Lösungen mit Diethylpyrocarbonat 0,2 % (DEPC), welches die RNAsen inaktiviert.

Es wurden dazu in 12 ml Reaktionsgefäßen 500 mg Gewebe oder  $2 \times 10^8$  Zellen in 5 ml GITC-Puffer mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol homogenisiert. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l Natriumacetat (2 M pH 4,0), 1,5 ml Chloroform und 4,5 ml wassergesättigtem Phenol wurde mit Hilfe eines Vortexers gut gemischt, die entstandene Lösung etwa 30 min auf Eis gestellt und nachfolgend durch Zentrifugation bei 8000 rpm/4 ° C/1h die Phasentrennung vollzogen. Die wässrige Oberphase, die die RNA frei von Proteinen und DNA enthält, wurde in ein sauberes Gefäß überführt und mit einem Isovolumen kalten Isopropanols (- 20 ° C/12h) über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation (8000 rpm/4 ° C/1h) wurde das RNA-Pellet mit kaltem 80% igem Ethanol gewaschen (30 min/4 ° C), anschließend luftgetrocknet, in einem geeigneten Volumen DEPC-Wasser gelöst und sofort bei - 80 ° C weggefroren.

#### **III.2.3.1.2. cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase**

Die Reverse Transkriptase verlängert an als Matrize dienender RNA angelagerte Primer zu einer komplementären, einzelsträngigen DNA. Durch Verwendung eines polyT-Primers, der an den polyA-Schwanz der mRNAs bindet, wird dabei nur die mRNA, nicht jedoch tRNA oder rRNA aus der eingesetzten Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben.

Zur Herstellung der cDNA wurde folgender Ansatz pipettiert:

4  $\mu$ l 5 x First Strand Synthesis Buffer

2  $\mu$ l DTT

1  $\mu$ l 10mM dNTPs

1  $\mu$ l 50mM polyT(18)Primer

10-15  $\mu$ g RNA

ad 19,2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Zuletzt wurden zu dem Ansatz 0,8 µl der Reversen Transkriptase (LIFE TECHNOLOGIES). hinzugegeben und inkubiert bei 40 ° C/64 min. Darauf folgte eine Denaturierung des Enzyms durch Erhitzung auf 70 ° C/10 min. Die so hergestellte cDNA wurde bei – 20 ° C gelagert.

### **III.2.3.1.3. RNA-Integritätskontrollen**

#### **β-Aktin-PCR**

Eine Kontrolle der Integrität der synthetisierten cDNA wird mit Hilfe der PCR-Technik durchgeführt, indem das in den meisten Geweben konstitutiv und hochabundant exprimierte β-Aktin-Gen („housekeeping gene“) aus der cDNA amplifiziert wird. Erhält man dabei in der PCR schon bei geringer Zyklenzahl eine deutliche β-Aktin-Bande im Agarosegel, so eignet sich eine solche cDNA für den weiteren Nachweis auch von weniger abundanten spezifischen Transkripten

Dazu wurden pipettiert:

23,8 µl H<sub>2</sub>O

3,0 µl Puffer

1,0 µl Primer A (β-Aktin-DNA 1)

1,0 µl Primer B (β-Aktin-DNA 2)

0,5 µl dNTP

0,2 µl Taq-Polymerase

Paraffin

0,5 µl cDNA

#### **Analytische Formaldehyd-Gel-Elektrophorese und fotografische Dokumentation der rRNA**

Qualität und Konzentration der RNA lassen sich nach der Auftrennung in einem analytischen MOPS-Gel und durch Vergleich mit einem RNA-Standard bekannter Konzentration beurteilen. Kommen dabei unter UV-Licht die 28S- und die 18S-ribosomale Bande sauber zur Darstellung kann von einer integren nicht degradierten RNA ausgegangen werden. Dies wird fotografisch dokumentiert.

RNA-Agarose-Gele wurden mit 1 x MOPS-Puffer gekocht. Vor dem Gießen wurde 10 % Formaldehyd zugesetzt, welches die Ausbildung von Sekundärstrukturen bei der einzelsträngigen

RNA verhindern soll. Ethidiumbromid wurde dabei nicht direkt dem Gel, sondern dem entsprechenden RNA-Laufpuffer zugesetzt. Zur Elektrophorese wurden die Gele mit RNA-Proben beladen und die Nukleinsäuren bei 60-80 V in der Elektrophoresekammer aufgetrennt.

### **III.2.3.2. RT-PCR**

Die RT-PCR ist eine sehr sensitive Methode, über die sich die Expression spezifischer Gene in verschiedenen Geweben untersuchen läßt. Die Aufdeckung restringierter Expressionsmuster ist mit diesem Verfahren schnell und mit einem relativ geringen Arbeitsaufwand durchführbar. Eine Quantifizierung der Expression in verschiedenen Geweben zur Detektion einer Überexpression oder gar Aussagen über Sequenz- oder Strukturalterationen der exprimierten Gene sind mit diesem Verfahren jedoch nicht möglich. Man schreibt die mRNA eines Gewebes, die die Gesamtheit der in diesem Gewebe transkribierten Gene repräsentiert, mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA um. Durch die Auswahl spezifischer Primer kann die Sequenz von Interesse durch PCR aus den cDNAs derjenigen Gewebe amplifiziert werden, die das entsprechende Transkript exprimieren. So ist die PCR (Polymerasekettenreaktion) ein Verfahren zur selektiven Anreicherung definierter Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (SAIKI et al., 1988). Man nutzt dabei die Eigenschaften von DNA-Polymerasen, die einen Einzelstrang zum DNA-Doppelstrang aufpolymerisieren können, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Durch Zugabe von zwei Oligonukleotidprimern (sense und antisense), die zum 5'- bzw. 3' - Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind und die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen ist eine automatisierte Durchführung der PCR in programmierbaren Thermoblöcken möglich. Es kommt dabei in einem dreiteiligen in Zyklen repetierten Reaktionsprozeß aus Primeranlagerung, Kettenverlängerung und Denaturierung der DNA-Doppelstränge zur exponentiellen Vermehrung der gewünschten Sequenzen. Einhergehend mit der so erzielten hohen Sensitivität der PCR besteht jedoch auch eine Anfälligkeit für Kontaminationen mit der Konsequenz falsch positiver Ergebnisse durch das Verschleppen von DNA in den Reaktionsansatz.

PCR-Untersuchungen wurden nach bekannten Standardprotokollen durchgeführt. Für den Ansatz wurde folgendes unter der sterilen Werkbank zusammenpipettiert und im Anschluss mit einem Tropfen Paraffin überschichtet:

23,8 µl H<sub>2</sub>O  
3,0 µl Puffer  
1,0 µl Primer A  
1,0 µl Primer B  
0,5 µl dNTP  
0,2 µl Taq-Polymerase

Vor dem Starten der PCR-Reaktion wurden jeweils 0,5 µl cDNA dazupipettiert.

Eine Etablierung der PCR auf die einzelnen Klone erfolgte durch Variieren von Zyklenzahl, Annealingtemperatur und Elongationszeit. Der Prototyp des Ablaufes der PCR-Reaktion war dabei wie folgt:

1. 94 ° C/2 min (Denaturierung)
2. 55-70 ° C/1min (Annealing; Temperatur abhängig vom GC-Gehalt der Primer)
3. 72 ° C/2 min (Elongation)
4. 94 ° C/1 min (Denaturierung)
5. zurück zu Schritt 2 und Wiederholung des Ablaufes für 35-40 Zyklen
6. Schritt: 8 min bei 72 ° C (Endelongation)
7. 4 ° C/∞

### **III.2.3.3. Northern Blots für Testis, Normalgewebe und Tumoren**

Die wesentlich aufwändigeren Northern-Blot-Untersuchungen (SAMBROOK et al., 1989) sind zwar weniger sensitiv als die RT-PCR, erlauben aber neben der Expressionsanalyse auch eine Quantifizierung der Transkriptmenge. Sie sind so auch von Relevanz, wenn alterierte Transkriptmengen vermutet werden oder aber zur Bestimmung von Transkriptvolllänge und deren Veränderungen durch Trunkierung oder Fusionen. Außerdem liefert die Northern-Hybridisierung einen Aufschluß über das Vorhandensein von Splicevarianten, wenn die Sonde mit mehreren RNAs unterschiedlicher Länge hybridisiert. Auch putative Domänen können so erkannt werden.

Zur Herstellung der Northern Blots wurden zunächst präparative MOPS-RNA-Gele hergestellt und die RNA nach Elektrophorese auf Hybond Membranen transferiert und einem Cross-linking



unterzogen. Der Unterschied zum analytischen Gel besteht darin, dass wesentlich mehr  $\mu\text{g}$  RNA pro Probe aufgetragen werden. Weiter wird dem Laufpuffer weniger Ethidiumbromid zugesetzt. Dazu wurden jeweils 10-20  $\mu\text{g}$  der extrahierten RNA mit einem Isovolumen RNA-Laufpuffer gemischt, 10 min bei 65 ° C denaturiert und dann in einem 1 % igen MOPS-Agarosegel mit 10 % Formaldehyd bei 60-80 V für etwa 5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Für das anschließende Kapillarblottingverfahren wurden auf das in eine Blottingkammer platzierte Gel eine Nylonmembran (Hybond N) und mehrere Lagen saugfähiges Whatman-Papier gelegt. Der kapilläre Transfer findet nun über 16 h mit 20 x SSC statt, welches vom unteren Teil der Blotkammer gegen die Schwerkraft durch Gel und Nylonmembran hindurch in den aufliegenden Filterpapierstapel gesaugt wird. Dabei werden die RNAs aus dem Gel mittransportiert und bleiben in der Nylonmembran hängen. Durch Bestrahlung mit 1,2 W UV-Crosslinker erfolgt eine kovalente Vernetzung der RNA mit der Nylonmembran (SAMBROOK et al., 1989).

#### **III.2.3.4. Qiaex**

Zur späteren Hybridisierung der geblotteten RNA mit den interessierenden cDNA-Fragmenten mussten diese per Qiaex aus einem Agarose-Gel extrahiert werden und anschließend zur Herstellung radioaktiver Sonden mit 32 P markiert werden.

Bei DNA-Fragmenten für Sonden handelt es sich meist um Fragmente, die entweder durch einen Restriktionsenzymverdau oder durch PCR-Amplifikation hergestellt werden. Sie liegen nach Auftrennung des jeweiligen Reaktionsansatzes im Agarosegel als Einzelbande vor und müssen aus dem Gel isoliert werden. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Qiaex II-Kits, bei dem das Gelstück mit der gewünschten Bande in einem Puffer mit einer hohen Salzkonzentration aufgelöst und die DNA dabei an ein Austauschharz gebunden wird. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Elution der DNA aufgrund der geringen Salzkonzentration des verwendeten bidestillierten Wassers.

Dazu wurde ausgewählte Plasmid-DNA mit dem interessierenden Insert der Klone sub T 25, sub T 37, sub T 39, sub T 44 und sub T 55 verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelstücke mit dem Insert wurden mit einem sterilen Skalpell unter schwachem UV-Licht ausgeschnitten und abgewogen. 100 mg Gel wurden mit 300  $\mu\text{l}$  Solubilizationspuffer QX 1 in Eppis gegeben, dann nochmals 800  $\mu\text{l}$  Puffer QX1 zum Aufbrechen des Gels dazugegeben. Dann wurden 10  $\mu\text{l}$  Harzmilch addiert und gemischt zum Binden der DNA. Dann wurde ca. 10 min bei max. 55 ° C inkubiert, bis das Gel gelöst war und mit max. Umdrehung kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden 500  $\mu\text{l}$  wash-buffer dazu pipettiert, gemischt,

zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen, nochmals zentrifugiert und der restliche Überstand vorsichtig mit kleiner Pipette entfernt. Das Pellet wurde getrocknet und danach in 20 µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O aufpipettiert, 5 min bei 55 ° C inkubiert, 3 min max. zentrifugiert und der Überstand, in dem jetzt die DNA gelöst war, in vorbeschriftete Eppis pipettiert (Fraktion 1 F 1). Der letzte Schritt wurde wiederholt und eine 2. Fraktion gewonnen. Zur Überprüfung wurde mit 1,0 µl DNA aus Fraktion 1 eine analytische Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt.

### **III.2.3.5. Labeling von Sonden**

Radioaktiv markierte Sonden wurden mit dem „Ready-to-go“ (RTG) DNA-Labeling-Kit (PHARMACIA) hergestellt. Dabei wird der zu markierende DNA-Strang mit nicht markierten Nukleotiden, radioaktiv markiertem Nukleotid (<sup>32</sup>P-α-dCTP) und Oligonukleotiden zufälliger Sequenz („random primer“) gemischt. Bei der Synthese entsteht dann ein radioaktiv markierter komplementärer Strang, der anschließend über eine Sephadex G 50 Säule (PHARMACIA), bei der die synthetisierten Oligonukleotide in einer früheren Fraktion eluiert werden als nicht eingebaute Nukleotide, aufgereinigt wird.

50-100 ng DNA (auch kleine Templatemenen bis 25 ng ausreichend, z. B. 0,5 µl Qiaex-DNA) wurden in 45 µl Wasser hitzedenaturiert (5 min/100 ° C), 5 min auf Eis gestellt und dann in das RTG-Reaktionsgefäß überführt und somit das Lyophilisat aus Nukleotiden, Primern und Polymerase renaturiert. Nach Zugabe von 50 µCi (5,0 µl) des radioaktiv markierten Nukleotids (<sup>32</sup>P α-dCTP) wurde 1h bei 37 ° C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde dann auf eine mit 3 ml TE-Puffer voräquilibrierte Sephadex G 50 Säule gegeben und in zwei Fraktionen mit jeweils 400 µl TE-Puffer eluiert. Die erste Fraktion enthält dann das aus der Säule verdrängte Äquilibratvolumen, die zweite Fraktion die radioaktiv markierte Sonde. Im weiteren Verlauf des Elutionsvolumens wurden die in der Säule zurückgehaltenen nichtinkorporierten Radionuklide eluiert (Cpm/µg = spezifische Aktivität mind. 10<sup>8</sup>).

### **III.2.3.6. Hybridisierungen („small scale“ und „large scale“)**

Bei der Northern-Blot-Hybridisierung wird mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde gegen aus verschiedenen Geweben extrahierte und auf Nitrocellulose geblottete RNA hybridisiert. Die zuerst durchgeführte „small scale“-Analyse erstreckt sich hier auf Testis, eine repräsentative Anzahl essentieller Normalgewebe und wenige Tumorentitäten. Die „large scale“-Analyse deckt

ein breiteres Gewebespektrum ab.

Hierzu wurde der RNA-Blot in 40 ml Hybridisierungslösung und 600 µl Salmon Sperm DNA zum Blocken unspezifischer Bindungen für etwa 4 Stunden prähybridisiert. Bei der eigentlichen Hybridisierung wurden 200 µl der zuvor nochmals 5 min bei 100 ° C denaturierten Sonde in 10 ml Hybridisierungslösung mit 10 % Dextransulfat für 12 h bei 42 – 65 ° C mit dem Blot unter Rotation inkubiert. Je nach der erwarteten Stärke des Signals wurden die Blots dann mit unterschiedlich stringenten Waschlösungen aus 2 - 0.5 x SSC und 0,1 % SDS gewaschen, um den bei der Entwicklung entstehenden Hintergrund aus unspezifischen Bindungen und Kreuzhybridisierungen zu minimieren (SAMBROOK et al., 1989). Im Anschluss wurden die Blots in Frischhaltefolie verpackt und in Screen-Kassetten mit Film (oder ohne Film bei Auswertung über Phosphor Imager) bei – 70 ° C eingefroren.

### **III. 2.3.7. Auswertung per Autoradiographie oder Phosphor Imager**

Die Entwicklung der Blots erfolgte mittels Autoradiographie in einer Röntgenfilmexpositions-kassette durch Auflage eines Röntgenfilms und Exposition bei - 70 ° C. In Abhängigkeit von der erwarteten Signalstärke erfolgt die Entwicklung des Films dann nach wenigen Stunden bis Tagen unter Sichtkontrolle (Rotlicht). Eine spezifische Bindung zeigt sich durch eine distinkte Bande an der Stelle, an der die Hybridisierung zwischen geblotteter RNA und DNA-Sonde stattgefunden hat. Statt der Autoradiographie ist die Detektion auch mittels eines Phosphor-Imagers durchführbar.

### **III.2.4. Klonierung der Gesamtlänge aus dem Phagemid**

Für die Klone sub T 25, sub T 39 und sub T 44 wurde versucht die Volllänge zu ermitteln, um weitergehende Analysen vornehmen zu können. Für die Klonierung der Gesamtlänge wurde eine RACE-PCR aus dem Phagemid pBK-CMV mit vektor- und insertspezifischen Primern gestartet.

#### **III.2.4.1. RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends)**

Das unbekannte 5'- Ende des Primärklons sub T 25 wurde mittels eines modifizierten RACE-Protokolls kloniert. Dabei wurde in Anlehnung an das klassische RACE-PCR-Verfahren (FROHMANN et al., 1988) statt eines „tailed primers“ („universelle“ Sequenz am 5'- Ende) ein

vektorspezifischer Primer gewählt. Die PCR-Produkte wurden über AMICON aufgereinigt und elektrophoretisch aufgetrennt, per Qiaex aus dem Gel ausgeschnitten, in Plasmide ligiert, transformiert, vermehrt, präpariert und sequenziert. Die Plasmidklonierung unterschiedlich langer PCR-Produkte aus unabhängigen PCR-Amplifikationen und deren Sequenzierung erlaubten schließlich die Zusammenstellung eines Contigs durch Vergleich der sich überlappenden Sequenzen, welcher dann den RACE-Klon sub T 25 repräsentierte und für den ein proteinkodierender Bereich und ein offenes Leseraster bestimmt werden konnten. Die RACE-Klonierungen für sub T 39 und sub T44 wurden entsprechend durchgeführt.

### **III.2.5. Chromosomale Lokalisation**

Die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation mittels Chromosomenmapping erfolgte über Unigene und BLAST an den Sequenzdatenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA).

### **III.2.6. Expressionsanalyse der RACE-Produkte**

#### **III.2.6.1. RT-PCR der RACE-Klone und Hybridisierungen „large scale“**

RT-PCR-Analysen der RACE-Klone wurden mit aus den RACE-Sequenzen ausgewählten Primern durchgeführt.

Die „large scale“ Hybridisierungen wurden sowohl mit dem Klon sub T 25 als auch mit sub T 25 RACE durchgeführt.

### **III.2.7. Immunologische Charakterisierung**

Nach der Untersuchung der Klone auf Transkriptebeene schließt sich eine Charakterisierung auf der Ebene der translatierten Proteine an. Im Rahmen des Western-Blotting (TOWBIN et al., 1989) werden dabei Proteine im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im elektrischen Feld auf Nylon- oder Nitrocellulosemembran übertragen. Durch Inkubation der Membran mit mono- oder polyklonalen Antikörpern gegen die interessierenden Proteine können diese detektiert und unter Nutzung von Entwicklersystemen aufgedeckt werden. Dieses Verfahren erlaubt sowohl quantitative wie auch qualitative Aussagen über das Translationsprodukt. Die im Rahmen dieser

Arbeit durchgeführten funktionellen Untersuchungen beschränkten sich auf die Analyse des Klons sub T 25.

### **III.2.7.1. Klonierung eines Expressionskonstruktes zur Herstellung von Protein sub T 25-pQE-30**

Zur Herstellung eines Expressionskonstruktes wurde zunächst der zu analysierende Genbereich, im Fall von sub T 25 der gesamte proteinkodierende Bereich mit der PCR-Technik aus Testis-cDNA amplifiziert, über spezifische Primerpaare dabei am 5'- und 3'-Ende mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme versehen, um eine Einklonierung in die entsprechenden Vektoren zu ermöglichen. Im Fall von sub T 25 geschah dies über Sense-Primer mit SacI-Site und Antisense-Primer mit HindIII-Site, da sub T 25 keine internen Schnittstellen für diese Restriktionsenzyme aufwies und sich das Produkt so optimal im Frame in einen pQE-30-Expressionsvektor klonieren ließ. Das PCR-Produkt wurde per Qiaex extrahiert und in einen pQE-Vektor mit Hilfe von DNA-Ligase des Bakteriophagen T 4 ligiert.

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 ist in der Lage, DNA-Moleküle mit kompatiblen kohäsiven Enden miteinander zu verbinden.

Zur Ligation wurde folgender Ansatz pipettiert:

2 µg geschnittene Vektor-DNA  
2 µg geschnittene Insert-DNA  
1 µl T4 Ligase 10 x Puffer  
1 µl T4 DNA-Ligase  
ad 10 µl H<sub>2</sub>O

Man inkubiert 12-16 h bei 14 ° C und kann die Ligation dann zur Transformation kompetenter Bakterien verwenden. Die Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Bakterien und nachfolgende Plasmidpräparationen ermöglichten schließlich die Selektion und Vermehrung des die richtige cDNA in der richtigen Orientierung enthaltenden Expressionskonstruktes. Orientierung und Identität des einklonierten Inserts wurden dabei über Restriktionsenzymverdau und Sequenzierung kontrolliert.

Rekombinante Proteine, die im prokaryontischen Expressionssystem hergestellt werden, dienen nicht nur als Grundlage zur Herstellung monoklonaler Antikörper, die unerläßliche Werkzeuge

für immunzytologische und immunhistologische Untersuchungen darstellen, sondern werden wie hier auch zum Aufbau von ELISA- oder Western-Blot-Systemen zum einfacheren Screenen größerer Anzahlen von Patientenseren benötigt. Die Verwendung der pQE-Vektoren (Qiagen) erlaubt die Herstellung großer Mengen rekombinanten Proteins im bakteriellen Expressionssystem. Dieses System erlaubt je nach Vektor die Platzierung eines 6 x His-tag-Epitops entweder am N- oder C-Terminus des konstruierten Fusionsproteins, welches die biochemischen und funktionellen Eigenschaften der entstehenden Proteine in der Regel nicht verändert, aber eine Aufreinigung und Konzentrierung der exprimierten Proteine über die Nickel-Nitrilotriacetic Säure (Ni-NTA) Technologie möglich macht.

Eine Kolonie von *E. coli*- Bakterien, die mit dem Expressionsplasmid (sub T 25 – pQE-30) transformiert wurden, wurden in Selektionsmedium (LB-Medium und Ampicillin) kultiviert und über Nacht bei 37 ° C geschüttelt. 200 µl der aufgewachsenen Vorkultur wurden in 10 ml frisches LB-Medium mit Ampicillin überführt und bei 37 ° C geschüttelt. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (= OD (optische Dichte) von 0,5-0,6 bei  $\lambda = 600$  nm) wurde den Bakterien IPTG (Endkonzentration: 2 mM) zugegeben, um die Proteinexpression zu induzieren. Die das rekombinante Protein exprimierende Bakterienkultur wurde nach einem experimentell bestimmten Zeitpunkt der maximalen Proteinexpression (1-5 h) geerntet, lysiert und das enthaltene rekombinante Protein aufgereinigt. Zur Bestimmung der Übernachts-Expression wurde die restliche Kultur über Nacht im Brutraum bei 37 ° C weitergeschüttelt und erst dann geerntet.

### **III.2.7.2. SDS-PAGE und Western Blot**

Nach Transformation in *E. coli*, Überprüfung der Sequenz und Induktion durch IPTG wurden Western Blots hergestellt und das 6 x His-tag-Protein mittels Markierung über die Bindung von His-6-tag-Antikörpern identifiziert. Durch Mitaufragen eines Proteinlängenstandards war es möglich, das Molekulargewicht des detektierten Proteins in kDA einzugrenzen und mit dem berechneten Molekulargewicht zu vergleichen.

Zur Extraktion der Proteine wurden die Bakterienpellets in 300 µl SDS-Proteinprobenpuffer unter Zugabe von 50 mM DTT für 10 min/100 ° C aufgekocht. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand, der die Proteine enthält, asserviert und bei – 20 ° C weggefroren. Vor Herstellung der Western Blots wurden die Proteine im SDS-PAGE (LAEMMLI et al., 1970) (Vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt.

Zur Durchführung wurden nach Standardprotokollen SDS-Polyacrylamidgele gegossen, mit gleichen Mengen der denaturierten Proteine (5 min/100 ° C) geladen und die Elektrophorese unter Verwendung eines Tris-Laufpuffers (Laemmli-Puffer) bei 200 V/40 min durchgeführt. Um die Proteine auf Nitrocellulose zu transferieren, wurden entsprechend des Semi-dry-Verfahrens (TOWBIN et al., 1989) das 10 min in Western-Blot-Transferpuffer äquilibrierte SDS-Gel und die Nitrocellulosemembran (Bio-Rad Membran) zwischen einigen Lagen puffergetränkter Filterpapiere direkt aufeinandergelegt und zwischen den Elektrodenplatten platziert. Beim Anlegen einer Spannung (21 V/20 min) wandern die negativ geladenen Proteine dann im elektrischen Feld Richtung Anode zur Membran und werden dort gebunden. Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose zur Kontrolle des Transfervorganges kurz mit Ponceau-Rot gefärbt. Nach dem Einzeichnen des Längenmarkers auf der gefärbten Nitrocellulose wurde diese mit TBS-T 3 x 10 Minuten entfärbt. Anschließend wurden für 60 Minuten mit 5 % Milch in TBS bei 37 ° C unspezifische Bindungen blockiert. Dann wurde eine Stunde mit dem primären Maus-Anti-6 x His-tag-AK und schließlich für eine Stunde mit dem AP-konjugierten sekundären Anti-Maus-Antikörper bei RT inkubiert. Die Antikörper sind in 0,5 % Milch/TBS geeignet verdünnt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die Membran jeweils 3 x 10 min in TBS gewaschen. In der Färbelösung des AP-Substrat-Kits und bei Raumtemperatur erfolgte die Entwicklung bis zur ausreichenden Intensität der braun-violetten Anfärbung spezifischer Antikörperbindungen.

### **III.2.7.3. Tests mit allogenen Normal- und Tumorseren zur Überprüfung der Antikörper-Reaktion**

Anschließend wurde die Reaktivität von Normal- und eines autologen Tumorserums getestet. Die Nitrocelluloseblots wurden in Petrischalen ausgelegt und mit jeweils 10 ml des verdünnten Serums überschichtet.

Während der erfolgenden Inkubation bei RT binden die im Serum vorhandenen Antikörper an die auf die Nitrocellulose geblotteten rekombinanten Proteine. Eine Detektion der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgt nach Waschen der Blots (3 x 15 min/TBS) mit Hilfe eines sekundären Antikörpers (Maus-Anti-human-IgG, AP konjugiert), der gegen das Fc-Fragment der Serumantikörper gerichtet ist und der für eine Stunde 1 : 2500 fach in 0,5 % Milch / TBS verdünnt mit den Blots inkubiert wird. Nach erneutem Waschen der Blots werden die gebundenen Antikörperkomplexe über die an den sekundären Antikörper konjugierte alkalische

Phosphatase (AP) sichtbar gemacht. Bei dieser enzymatischen Farbreaktion wandelt das Enzym die Substrate 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblue-Tetrazoliumchlorid (NBT) im alkalischen Milieu in farbige Reaktionsprodukte um, die an der Stelle der Antikörperbindung präzipitieren. Dazu werden 15 ml Substrat enthaltende alkalische Entwicklerlösung (CDS mit 10 mg/100 ml NBT und 5 mg/100 ml BCIP) auf die Blots gegeben. Anschließend wird unter Lichtschutz entwickelt, bis gut sichtbare Reaktionen entstehen. Als positiv werden solche Banden gewertet, die sich in der Intensität der Farbreaktion auf der Nitrocellulosefolie deutlich von den umliegenden Banden unterscheiden und deren Höhe dem errechneten Molekulargewicht entspricht.

#### **III.2.7.4. Prädiktion funktioneller Domänen**

Die Identifizierung funktioneller Domänen mit Hinweis auf bindende Proteine oder lineare Peptide, die Immunantworten induzieren könnten, sowie Voraussagen zur Tertiär- oder Quartärstruktur erfolgte mit Hilfe spezieller Software. Zur Vorhersage von Peptidmotiven und MHC-Liganden wurden neben Programmen wie PROSITE, SWISS PROT und Pfam auch Programme wie SYFPEITHI herangezogen (FALK et al., 1991). Die Erstellung potentieller Hydrophobizitätsprofile konnte über TMPred erfolgen (HOFMANN et al., 1993).



## IV. Ergebnisse

Über Plasmidpräparation wurde die DNA einer repräsentativen Anzahl von Klonen aus einer subtraktiven Testis-Bank isoliert. Für 55 Klone wurde eine Sequenzierung und Datenbankanalyse durchgeführt, auf deren Grundlage Klone (sub T für subtraktiver Testis-Klon) für eine Primärcharakterisierung (SAHIN et al., 1997; TÜRECI et al., 1997) ausgewählt wurden:

1. Sequenzanalyse
2. Datenbankanalyse
3. Expressionsanalyse 4 ausgewählter Klone (sub T 25, sub T 37, sub T 39 und sub T 44) per RT-PCR und Northern Blot
4. Weitere Analysen ausgewählter cDNAs aufgrund von Expressionsdaten (sub T 25, sub T 39, sub T 44)
  - Klonierung der Gesamtlänge
  - Bestimmung eines ORF und Analyse der Aminosäuresequenz
  - Bestimmung der chromosomalen Lokalisation

Eine immunologische Charakterisierung wurde nur für den Klon sub T 25 versucht.

Zusammenfassend fanden sich bei der Sequenzierung von 55 Klonen nach der DNASIS- und Blast Search-Sequenzanalyse 16 differente Transkripte (ALTSCHUL et al., 1991). 12 Klone zeigten aufgrund ihrer Identität oder ihrer Homologien zu Protamin (DOMENJOUR et al., 1988) und Cathepsin L 2 (SLOANE et al., 1981; CHAUHAN et al., 1991) Testisspezifität. Auch der Klon sub T 24 war identisch zu einem Klon, der am DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) aus adultem Testis isoliert worden war (POUSTKA and WIEMANN, 1999). 4 Klone (sub T 25, sub T 37, sub T 39 und sub T 44) wurden mit einem zunächst neuen mRNA-Transkript identifiziert und auf ihre Expression in Testis, Normalgewebe und Tumoren untersucht.

Für die Klone sub T 25, sub T 37 und sub T 39 konnte im Northern Blot für Testis und Normalgewebe die Testisspezifität hinreichend gezeigt werden. Die Klone sub T 25 und sub T 37 zeigten außerdem eine Assoziation zu Tumoren. Sub T 25 wurde in zwei von 10 getesteten Bronchialkarzinomen, einem Hodentumor und einem Nebenschilddrüsentumor exprimiert. Sub T 37 war in drei von drei getesteten Tumoren positiv (Hodentumor, Parathyroidtumor und Bronchialkarzinom).

Bei der Sequenzierung von 55 Klonen ergaben sich im wesentlichen 3 Hauptgruppen:

1. Nicht testisspezifische oder vorcharakterisierte Klone
2. Testisspezifische und bekannte Klone
3. Unbekannte Klone oder noch nicht näher charakterisierte Klone

#### **IV.1. Nicht testisspezifische oder vorcharakterisierte Klone**

Diese Klone wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen: Es handelte sich dabei um:

##### **1.1. Die Klongruppe sub T 1 - Ubiquitär exprimierte Klone oder Expression in Gehirn oder Thymus**

Hierbei handelte es sich um Klone mit ubiquitärer Expression (physiologische Expression in vielen Normalgeweben) oder nicht restringierte Expression in Gehirn, Leber oder immunologisch bedeutsamen Normalgeweben wie Thymus (sub T 1-16, sub T 30, sub T 38, sub T 40 , sub T 47).

##### **1.2. Die Klongruppen sub T 17, sub T 45 und sub T 50 - Klone mit hochrepetitiven Elementen**

Einige Klone, so auch die Klongruppen sub T 17, sub T 45 und sub T 50, enthielten neben Homologien zu Protamin und vielen Homologien über BLAST n/dbest als Hinweis auf ubiquitäre Expression, überwiegend hochrepetitive ALU-Sequenzen.

##### **1.3. Der Klon sub T 38 - Bekannte und vorcharakterisierte Transkripte**

Klone, die homolog waren zu ribosomaler RNA, tRNA, mitochondrialer RNA und zu Vektorsequenzen (sub T 38), die sich in erster Linie auf Verunreinigungen der subtraktiven Ausgangsbank oder durch ineffektive Ligation zurückführen ließen, waren nicht weiter verwertbar.

#### **IV.2. Testisspezifische und bekannte Transkripte**

12 Klone waren hochhomolog zu Protamin oder waren identisch zu Cathepsin L2 (DOMENJOUD et al., 1991; SANTAMARIA et al., 1998).

## **2.1. Der Klon sub T 20 - Homologien zu Cathepsin**

Der Klon sub T 20 stellte mit einer Länge von 409 bp ein partielles Transkript der Homo sapiens mRNA für Cathepsin L 2 dar. Cathepsin L 2 wird normalerweise exprimiert in Testis und Thymus, wobei die Thymusexpression ein Ausschlußkriterium für eine Immuntherapie darstellt. Cathepsin L 2 ist außerdem ein von Mammakarzinomen und kolorektalen Karzinomen produziertes Protein (SANTAMARIA et al., 1998).

Der Sequenz-Homologievergleich über Blast Search ergab für sub T 20 (1-409 bp) eine Homologie von 95 % in blast n/nr auf m-RNA-Ebene zu Cathepsin L 2 (1342 bp) im Bereich von 418-826 bp in sense-Orientierung. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dieser Übereinstimmung um eine nicht signifikante handelt, wird über BLAST mit 0 angegeben. In blast x/nr ergaben sich dieselben Homologien wie in n/nr: Die Sequenz kodierte für die Aminosäuren 117-252 von Cathepsin L 2, einem aus 334 AS bestehenden Protein. In blast n/dbest wurde eine zu 97 % zu Cathepsin L 2 - Precursor identische Sequenz aus einem Kolonkarzinom bestimmt. Die chromosomale Lokalisation wird mit Chromosom 9q21-q22 angegeben (ITOH et al., 1999).

Embl/Y14734/HSY14734 Homo sapiens mRNA for cathepsin L2

Length = 1342

Score = 664 bits (334), Expect = 0.0

Identities = 389/409 (95%), Positives = 389/409 (95%)

```
Query: 1      tctgtggattggagaaagaaaggctacgtgacgccagtgaagaatcagaaacagtgtggt 60
            |||
Sbjct: 418    tctgtggattggagaaagaaaggctacgtgacgccagtgaagaatcagaaacagtgtggt 477

Query: 61      tcttgttgggcttttagtgcgactkgtgctcttgaaggacagatgttccggaaaactggg 120
            |||
Sbjct: 478    tcttgttgggcttttagtgcgactggtgctcttgaaggacagatgttccggaaaactggg 537

Query: 121     aaacttgctctcactgagcgagcagaatctggtggactcttcgcgtcctcaaggcaatcag 180
            |||
Sbjct: 538     aaacttgctctcactgagcgagcagaatctggtggactgttcgcgtcctcaaggcaatcag 597

Query: 181     ggctgcaatggtggcttcatggctagggccttccagtatgtcaaggagaaacggaggcctg 240
            |||
Sbjct: 598     ggctgcaatggtggcttcatggctagggccttccagtatgtcaaggagaaacggaggcctg 657

Query: 241     gactcttaggaatcctatccatathtagcagtggtgaaatctttaagtacagacctcag 300
            |||
Sbjct: 658     gactctgaggaatcctatccatatgtagcagtggtgaaatctgtaagtacagacctgag 717

Query: 301     aattcttttttctaattacacttgcttcacaatggctcgacacttgaaagcagaaggccctc 360
            |||
Sbjct: 718     aattctgttgctaataacacttgcttcacagtggtcgacacttgaaagcagaaggccctg 777

Query: 361     atgaaagcagtcaccaactattggggcccatctcccttgctattnatgcag 409
            |||
Sbjct: 778     atgaaagcagtcgcaactgtggggcccatctccgttgctatggatgcag 826
```

**Abb. 1:** Homologievergleich BLAST n/nr von sub T 20 und Cathepsin L 2

## **2.2. Der Klon sub T 22 - Homologien zu Protamin**

Mehrfach fanden sich signifikante Übereinstimmungen zu Protamin (Klone sub T 17, sub T 22, sub T 32, sub T 55). Bei Protamin handelt es sich um ein basisches Protein, das in Spermien bzw. in Hodengewebe einen Ersatz für die in den anderen Geweben vorhandenen Histonproteine repräsentiert (DOMENJOUR et al., 1991). Da diese Klone oft nur teilweise zu Protamin identisch sind und noch partielle Transkripte enthalten, die ubiquitär vorkommen, außerdem teilweise Alu-Sequenzen enthalten, wurden sie nicht weiter untersucht.

## **2.3. Der Klon sub T 24 - Homologien zu DKFZp43D0635**

Der Klon sub T 24 stellt mit 802 bp ein partielles Transkript des Klones DKFZ p43D0635 mit 2767 bp dar. Dieser Klon wurde laut Genbankinformation aus humanem adultem Testis isoliert. RT-PCR-Analysen zeigen aber ebenfalls eine Expression in einer Reihe anderer Normalgewebe wie Gehirn, Herz, Lunge, Niere (POUSTKA and WIEMANN, 1999). Der Datenbankvergleich zeigt viele d/best: Normalgewebe und Tumoren. So wird der Klon sub T 24 ubiquitär exprimiert und wurde nicht weiter untersucht.

## **IV.3. Unbekannte Klone oder nicht näher charakterisierte Klone**

Nur die Klone sub T 25, sub T 37, sub T 39 und sub T 44 wurden einer Expressionsanalyse zugeführt, da im Datenbankvergleich zunächst keine signifikanten Homologien gefunden wurden. Im weiteren Verlauf der Arbeit und des Humangenomprojektes wurden jedoch auch zu diesen Klonen Homologien gefunden, die im Anschluss beschrieben werden. Da es sich aber dennoch auch hinsichtlich der Fragestellung um zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig charakterisierte Transkripte handelte, wurden die Analysen weiter durchgeführt.

Eine zusammenfassende Übersicht zeigt Tab. 1 :

**Tabelle 1: Sequenzierungsergebnisse und Homologievergleich über BLAST/Search für 55 Klone**

Klon	Länge (bp)	BLAST n/nr und x/nr	BLAST n/dbest	Expression/ Chromosomale Lokalisation
Sub T 1 – 16 Sub T 30 Sub T 40 Sub T 53 Sub T 54	513 894 985 894	n/nr: Keine  x/nr: keine	Life tech mouse embryo, brain, fetal liver, fetal lung  Thymus	ubiquitär
Sub T 17 Sub T 23 Sub T 26 Sub T 32 Sub T 33 Sub T 36	1100 1100 1100 980 980 1400	N/nr: Human mRNA for protamine 2 (1-384 bp)  x/nr: Homo sapiens hypothetical protein FLJ10704: Teratokarzinom FLJ20092: Colon (384-1100 bp) Sequenzbereich 1950-2650  Alu subfamily sequence contamination (519-388 bp)	Testis Retina Uterus Melanozyten Weitere Normalgewebe	ubiquitär
Sub T 18 Sub T 21 Sub T 31 Sub T 46 Sub T 49 Sub T 52	- - 593 242 - -	Vektor	Vektor	Vektor
Sub T 19	594	Infant brain  151 bp keine	Infant brain, life tech mouse embryo 151 bp keine	Gehirn  151 bp neu
<b>Sub T 20</b>	409	n/nr: Homo sapiens mRNA for <b>cathepsin L 2</b>  x/nr: <b>Cathepsin L 2</b>	NCI CGAP Co12 Homo sapiens cDNA (Colon-CA): similar to cathepsin L precursor human	<b>Testis und Thymus</b>  Expression in kolorektalen Karzinomen
<b>Sub T 22</b>	894	Human lar. gene for <b>protamine 2</b>	EST 96416 Testis I	<b>Testisspezifisch</b>

<b>Sub T 24</b>	802	Homo sapiens KIAA0724 gene product: adult brain, late gestation lung  Ran binding protein 13  <b>DKFZ p434D0635: adult testis</b> Hypothetical protein	Colon, RCC, head-neck, metastas. Mamma-CA, Testis	Ubiquitär  RT-PCR: Gehirn, Herz, Testis, Lunge, Muskel, Niere (POUSTKA et al., 1999)
<b>Sub T 25</b> Sub T 29  <b>RACE</b>	230  850	Homo sapiens mRNA for <b>kinesin protein</b>  Volllänge 2335 bp	NIH MGC 97: <b>Testis</b>	<b>testisspezifisch</b>  <b>Expression in Bronchialkarzinomen Nebenschilddrüsen-Tumor Hodentumor</b>  Chromosom 17
Sub T 27	88	keine	keine	zu kleines Transkript
Sub T 28	894	keine	Fetale Lunge, Testis, B-Zellen, brain	ubiquitär
<b>Sub T 37 Testis-spezifisch</b> Sub T 34 Sub T 35	1805 894      513  310  88	<b>MDM2 Oncogene, Exon 9</b> HLA-B gene for MHC-class antigene Kinesin-like-protein Breast Cancer BRCA1 gene, Exon 2     <b>Homo sapiens X-box-binding protein 1 (XBP1)</b>  <b>Kinesin-like-protein</b>  XBP1	HUVEC subtracted library Human umbilical vein endothelial cell Testis embryonal carcinoma Testis   ubiquitär	<b>Expression in allen getesteten Tumoren</b>  (MDM2: ubiquitär Chr. 12 MHC: Chr. 6)  <b>x-box: ubiquitär</b> Chr. 22 u. 5  <b>Kinesin:</b> vgl. sub T 25: Chr. 17
Sub T 38	272	Mitochondrial DNA, complete Genome 16S ribosomal RNA	Plazenta	
<b>Sub T 39</b>	314	Human clone RP11-542K23 on chromosome 9  Homo sapiens <b>prostaglandin peroxide H-synthase-1</b> partial 3'UTR: Megakaryoblasten	HUMGS000681 <b>Human gene signature 3'</b>	blast/hgs: Chromosome 9 clone RP11-563N7

Sub T 41	398	Homo sapiens gamma SNAP mRNA, complete cds Melanozyten,Thrombozyten  Gamma-Soluble NSF Attachment Protein (SNAP)	Fetal heart	ubiquitär
Sub T 43	60	keine	keine	Zu kleines Insert
<b>Sub T 44</b> Sub T 42  <b>RACE</b>	665 - 433 - 215  710	N/nr: Mus musculus adult male small intestine  x/nr: keine	Identisch: adulte  1. NIH MGC 95: brain: hippocampus  2. NCI GCAP Lu 5 Homo sapiens lung carcinoid  3. IL2-NT: Nerventumor  4. 3prime NIH MGC 7: small cell carcinoma lung  Hochhomolog: Prostata, Niere, Testis	Ubiquitär  blast/hgs: Chromosome 2 clone RP11-478-L9
Sub T 45 Sub T 48	398	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10704: Teratokarzinom Sequenzbereich 2659-2983	Soares NSF F8 9W OT PA P: 5 gepoolte Normalgewebe	Ubiquitär  Fortsetzung des Transkriptes von sub T 17
Sub T 47	750	Life tech mouse embryo	keine	Ubiquitär  Teilhomolog zu sub T 1
Sub T 50 Sub T 51 Sub T 55	1000 1100 1100	<b>Protamin</b> ( human PRM1 + 2 gene)  <b>ALU</b>	Tonsillen, B-Zell-Keimzentrum, Protamin, EST Testis I  Retina, Uterus, ALU	Ubiquitär  Teilhomolog zu sub T 17



Es ergeben sich 16 differente Transkripte, die überwiegend ubiquitär exprimiert werden. Die Klongruppen sub T 45 und sub T 50 sind untereinander teilhomolog bzw. die Fortsetzung des Transkriptes der Klongruppe sub T 17 und wurden nicht als differentes Transkript gewertet. Hier finden sich immer wieder repetitive transponierbare Alu-Elemente. Die Klone sub T 37 und sub T 44 enthalten interne Schnittstellen: Die Länge der Teilfragmente im Restriktionsverdau ist angegeben. NCI GCAP – National Cancer Institute Genome Cancer Anatomy Project. NIH MGC – National Institute of Health Mammalian Gene Collection

Die Ergebnisse für die Klone der Klongruppe 3 werden einzeln zusammengefasst:

#### **IV.4. Der Klon sub T 25**

##### Sequenzanalyse von sub T 25

Der Klon sub T 25 wurde zunächst durch ein Insert von 230 bp repräsentiert ohne Start- und Stopcodon mit einem unvollständigen ORF, der für ein neues, bis dato nicht beschriebenes Kinesin-like-Protein kodierte. Diese Sequenz war in antisense-Orientierung identisch zu dem aus der vorliegenden subtraktiven Testis-cDNA-Bank isolierten Klon sub T 29. Bei der Sequenzierung ergaben sich über Blast n/nr und Blast n/dbest in keiner Orientierung bekannte homologe mRNA-Sequenzen. Über Blast x/nr ergaben sich in Sense-Orientierung Teilhomologien zu Kinesin-like-proteinen 2beta (mus musculus, source house mouse) (SANTAMA et al., 1998), kinesin heavy chain member 2, einem humanem kinesin-related gene (HK 2) (DEBERNARDI et al., 1997) und kinesin-like-protein KIF 2 (mus musculus). Kinesin-like Proteine sind während der Mitose assoziiert mit Aufbauelementen des Spindelapparates, der Mikrotubuli und des Zentromers, mit der Regulation der Mikrotubuli-Dynamik, fungieren häufig auch als ATP-Bindungsstelle und spielen eine essentielle Rolle bei der Teilung der homologen Chromosomen und der Signaltransduktion (WORDEMAN et al., 1995; SPERRY et al., 1996; WALCZAK et al., 1996; KIM et al., 1997; ADAMS et al., 1998; HIROKAWA et al., 1998).

Die RACE-Klonierung des 5'Endes für sub T 25 ergab nach Zusammenstellung eines Contigs aus überlappenden unabhängigen Amplifikationen unterschiedlicher Länge eine neue Sequenz von 850 bp (sub T 25 RACE). Die ersten 48 Basen repräsentieren die 5'untranslatierte Sequenz. Ein Startcodon bei Position 49 markiert den immer noch unvollständigen ORF von 802 bp, dem weder ein Stopcodon noch eine 3'untranslatierte Sequenz mit Poly-A-Tail folgt. Demnach würde der ORF für ein partielles Polypeptid mit 267 AS kodieren. Dieses Translationsprodukt wies ebenfalls eine signifikante Homologie zu den Aminosäuresequenzen der Kinesin-like-protein-Familie auf.

Ein später durchgeführter Homologievergleich zeigte eine Übereinstimmung zum 5'-Bereich von humanem Kinesin. Dabei handelt es sich um eine für ein Kinesin-Protein (NYD-KIF2) kodierende Sequenz, die während des zeitlichen Rahmens der vorliegenden Arbeit in der Datenbank (ACC.No. AF333335) eingetragen wurde und testisspezifisch ist (SHA et al., submitted 2001). Signifikante Homologien zu anderen humanen und artfremden Kinesinen sowie assoziierten Proteinen finden sich in den Datenbanken zu diesem Zeitpunkt nicht (NAKAGAWA et al., 1997). Assoziationen dieses testisspezifischen Kinesins zu Tumoren sind bislang nicht beschrieben (LAI et al., 2000). Der Klon sub T 25 RACE ist im Bereich der Basen 87 - 936 fast vollständig identisch mit dem 5'Ende der 2335 bp langen mRNA für Kinesin. Sowohl die 5'UTR Region, als auch Startcodon sowie der für den N-Terminus des Proteins kodierende Bereich sind bis auf 8 Nukleotide identisch. Diese führen zur Veränderung von 7 Triplets und zum Austausch von sechs Aminosäuren, darunter zwei Aminosäureaustausche in einem hochkonservierten Genbereich von Kinesin, der eine Motor-Domäne enthält (BLOOM et al., 1995).

Die Homo sapiens mRNA für Kinesin (NYD-KIF2) wird durch eine Sequenz von 2335 Basen repräsentiert, deren Primärtranskript keine Introns enthält. Eine Promotorregion oder Consensussequenz in der Precursor-RNA sind nicht beschrieben, so dass die Regulation der Transkription nicht bekannt ist. Die 5'UTR untranslatierte Region reicht von Basenpaar 1-134 und ist damit überdurchschnittlich lang. Inwieweit die Translationseffizienz dadurch beeinflusst wird, kann nicht beantwortet werden. Das Startcodon ATG befindet sich in Position 135-137 und ist dabei von einer charakteristischen Erkennungssequenz ACCATGGCCAGCCA flankiert. Das Stopcodon TGA in Position 2154-2156 terminiert den Leserahmen. Der kodierende Bereich erstreckt sich über 2021 Basen, mit einem ORF, der für ein Polypeptid mit 673 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von ca. 94 kDa kodiert. Bei der Suche in konservierten Regionen und Consensussequenzen über die Pfam und PROSITE Datenbank (BAIROCH, et al. 1997) wird im Bereich der AS 219-547 (Pfam) oder 210-473 (PROSITE Pattern) die Lage einer hochkonservierten Region, einer Kinesin-Motor-Domäne angegeben. In der Nukleotidsequenz liegt der hierfür kodierende Bereich zwischen Position 666-1641. Der translatierte Bereich vor der Motor-Domäne reicht von 135-665 bp über 219 AS und nach der Motor-Domäne von 1642-2156 bp über 126 AS. Kinesin rechnet damit zu den M-Kinesinen oder zum „middle motor domain type“ (MIKI et al., 2001), mit einem 5' Sequenzblock vor und einem 3'-Sequenzblock nach der Motor-Domäne. Weitere Motive in der Sequenz und Prädiktionen zu möglichen posttranslationalen Modifikationen sind unter der Aminosäuresequenz beschrieben (NAVOLANIC et al., 2000).

## Nukleinsäuresequenz von Kinesin (NYD-KIF2)

```

1  gggggcgcta ggctcacaaa ggcaggcaca gactgcaacc ctgctcagtg ctccgggcgc
61  ttcaggctgg cttgggtcct gctgctccaa cccaagggc cctggagcgc tccctgatac
121 ctccatcact caccattggcc agccagttct gcctccctga atcccatgt ctctcgcccc
181 tgaaaccctt gaagccacat ttcggagaca tccaagaggg catctacgcg gcgatccagc
241 gcagtgacaa gcggatccac ctcgctgtgg tcacggagat caacagagaa aactattggg
301 tcacggtaga gtgggtggag aaagcagtca aaaaaggcaa gaagattgac ctggagacca
361 tactcctgct gaatccagct ctggactctg ctgaacaccc catgccgccc ctgcccttat
421 ccccttggc tctggcgccc tcttcggcca tcagggacca gcgtaccgtc acgaaatggg
481 ttgcgatgat cccccagaaa aaccaaacag cctcagggga cagcctggat gtgagggctc
541 ccagcaaacc ttgtctgatg aagcagaaaa agtctccctg cctctgggaa atccagaaac
601 tgcaggagca gcgggaaaag cgcaggcggc tgcagcagga gatccgagct agacgcgccc
661 tcgatgtcaa taccagaaac cccaactacg aaatcatgca catgatcgaa gagtatcgca
721 ggcacctgga cagcagcaag atctcagtcc tggagcccc gcaagaacat cgcctctgcg
781 tctgcgtgag gaagcggcct ctcaaccagc gagagacaac cttgaaggac ctggatatca
841 tcaccgtccc ctcggaacaat gtggttatgg tgcatgagtc caagcaaaag gtggacctca
901 ctcgctacct gcagaaccag accttctgct tcgaccatgc cttcgatgac aaagcctcca
961 acgagttggt gtaccagttc accgccagc cactggtgga gtccatcttc cgcaagggca
1021 tggccacctg ctttgcctat gggcagacga gaagtgggaa gacgtacacc gtgggtggag
1081 acttttcagg aacggcccaa gattgttcta agggcattta tgctctggtg gcacaggatg
1141 tctttctcct gctcagaaac tccacatatg agaagctgga cctcaaagtc tatgggacat
1201 tttttgagat ttatgggggc aaggtgtatg atttgttgaa ctggaagaag aagtgcaag
1261 tccttgagga tggcaatcag caaatccaag tggtcgggct gcaggagaaa gaggtgtgtt
1321 gtgtggagga agtgctgaac ctggtggaaa tagggaatag ctgtcggact tccaggcaaa
1381 catctgtcaa cgctcactca tccaggagcc atgcagtgtt ccagatcatc ctgaagtcag
1441 gagggataat gcatggcaag ttttccctcg ttgatttagc tgggaatgaa agaggagcag
1501 atacaaccaa ggccagccgg aaaaggcagc tgggaaggggc agagattaac aagagtcttc
1561 tagccctcaa agaattgatt ctggccttgg gtcagaacaa gcctcacacc ccattcagag
1621 ccagcaaaact cgcactgggtg ctccgagact cttttatagg ccagaactcc tccacttgca
1681 tgattgctac catctctccg gggatgacct cttgtgaaaa cactctcaac actttaagat
1741 atgcaaacag agtaaaaaaa ttaaatgtag atgtaaggcc ctaccatcgt ggccactatc
1801 cgattggaca tgaggcacca aggatgttaa aaagtcacat cggaaattca gaaatgtccc
1861 ttcagaggga tgaatttatt aaaatacctt atgtacagag tgaggagcag aaagagattg
1921 aagaggttga aacattaccc actctgttag ggaaggatac cacaatttca gggaagggat
1981 ctagccaatg gctggaaaac atccaggaga gagctggtgg agtacaccat gatattgatt
2041 tttgcattgc ccggtctttg tccatttttg agcagaaaaat tgatgctctg accgagatcc
2101 aaaagaaact gaaattatta ctagtgcac tccacgtgaa gagcaaggta gagtgaagcc
2161 aatggcgaga gatcaggtcc gaaatgctgc attgctgcag tttccaccac tcttatacag
2221 gaaaactgtc caaattatct aaagatcctc ctgagaagct taaaacatct taaaatacac
2281 tgatgggaaa catgctcttt cttctgcctc tgttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

```

Abb. 2 : Nukleinsäuresequenz von Kinesin (NYD-KIF2). Homologie des RACE-Klons sub T 25 zur Gesamtsequenz unterstrichen. **Ursprungsinsert** blau **Start- und Stopcodon** fett gedruckt. **Kodierender Bereich für Kinesin-Motor-Domäne:** fett. *Kodierender Bereich für Transmembranhelix:* kursiv. 5' UTR: 1-134 bp. 3'UTR: 2157-2335 bp. **Nukleotidabweichungen** zum RACE-Klon sind rot gekennzeichnet: Transversionen: Positionen 916 und 919. Transitionen: Positionen 229, 347, 412, 469, 576, 918.

## Aminosäuresequenz von Kinesin (NYD-KIF2)

```

1 masqfclpes pclsplkplk phfgdiqegi yaaiqrskdr ihlavvtein renywvtvew
61 vekavkkgkk idletillln paldaehpm pp1plsplal apssairdqr tvtkwvamip
121 qknqtagds ldvrvpkpc lmkqkspcl weiqklqeqr ekrrrlqgei rarraldvnt
181 rnpnyeimhm ieeyrrhlds skisvleppq ehricvcvrk rplnqrett1 kdldiitvps
241 dnvvmvhesk qkvdltrylq nqtfcfdhaf ddkasnelvy qftaqplves ifrkgmtatcf
301 aygqtrsgkt ytvvgdfsgt aqdcskgiya lvaqdvflll rnstyeikdl kvygtffei
361 ggkvydllnw kklqvledg nqqiqvvgll ekevccveev lniveignsc rtsrqtvsna
421 hssrshavfq iilksggimh gkfslvdlag nergadtka srkrqlegae inksllalke
481 cilalgqnkp htpfraskla lvlrdsfigg nsstcmiati spgmtscent lntlryanrv
541 kklndvvrpy hrghypighe aprmlkshig nsemslqrde fikipyvqse eqkeieevet
601 lptllgkdt isgkgssqwl eniqeraggv hhdidfcia slsileqkid alteiqklk
661 llladlhvks kve

```

Abb. 3 : Aminosäuresequenz von Kinesin NYD-KIF2 : unterstrichen ist die Homologie des RACE-Produktes sub T 25 zu Kinesin Protein NYD-KIF2. Rot gekennzeichnet sind die Positionen der **sechs Aminosäuren, die vom RACE-Produkt abweichen**. Durch Fettdruck hervorgehoben ist der Bereich der **Kinesin-Motor-Domäne**. Es ist zu sehen, daß das RACE-Produkt gerade noch den Beginn der Motor-Domäne mit Kinesin teilt. **Motive** : ATP/GTP-binding site motif Position 303-310. Kinesin motor domain signature Position 441-452. Transmembranhelix Position 507-527 inside to outside und 517-527 Prokar. Lipoprotein A. Motiv. Nukleäre Lokalisationssignale Positionen 162 und 219. ER Membran Retention Signal 669-672. Leucin-Zipper-Motiv Position 645-666. Weitere Motive siehe Tabelle 2.

### Nukleotidabweichungen und die assoziierten AS-Austausche Kinesin NYD-KIF2 gegen sub T 25 RACE

229	C gegen T	Triplett GCG gegen GTG	AS 32 A gegen V Alanin gegen Valin
347	T gegen C	Triplett ATT gegen ATC	AS I Isoleucin kein Austausch
412	T gegen C	Triplett CTG gegen CCG	AS 92 L gegen P Leucin gegen Prolin
469	T gegen C	Triplett GTC gegen GCC	AS 111 V gegen A Valin gegen Alanin
576	C gegen T	Triplett CCC gegen TCC	AS 148 P gegen S Prolin gegen Serin
916	A gegen C	Triplett AAC gegen ACC	AS 261 Asparagin gegen Threonin
918	C gegen T sowie		
919	A gegen C : zusammen im Triplett CAG gegen TCG AS 262 Glutamin gegen Serin		

## Aminosäuresequenz des sub T 25 RACE-Klons

1	masqfclpes	pclsplkplk	phfgdiqegi	y <b>v</b> aiqrskdr	ihlavvtein	renywvtvew
61	vekavkkgkk	idletillln	paldsaehpm	pp <b>p</b> plsplal	apssairdqr	t <b>a</b> tkwvamip
121	qknqtasgds	ldvrvpkpc	lmkq <b>k</b> <b>s</b> scl	weiqklqeqr	ekrrrlqei	rarraldvnt
181	rnpnyeimhm	ieeyrrhlds	skisvlepp <b>g</b>	<b>eh</b> ricvcrk	rplnqrettl	kdldiitvps
241	<b>dn</b> vvmvhesk	qkvdltrylq	<b>t</b> stfc			

Abb. 4 : Putative AS-Sequenz des sub T 25 RACE-Klons sub T 25 Kursiv: *Beginn der Kinesin-Motor-Domäne* (PROSITE). Fett: **Kinesin-Motor-Domäne** (PROSITE und Pfam). Der **Austausch** der **sechs Aminosäuren** ist auf Abweichungen in der Nukleinsäuresequenz zurückzuführen. Im RACE-Produkt sub T 25 kommt es zu zwei Aminosäureaustauschen innerhalb der hochkonservierten Motor-Domäne: an Position 261 ist Asparagin durch Threonin ersetzt und an Position 262 Glutamin durch Serin: dadurch geht ein N-Glykosylierungsmotiv (NQTF gegen TSTL) verloren. Position 29-34 Verlust eines N-Myristoylierungsmotivs. Im Bereich 145-148 entsteht durch den Austausch von Prolin gegen Serin ein **cAMP-abhängiges Phosphorylierungs-Motiv für Proteinkinase**.

Eine Transmembranhelix mit einer Länge von 21 AS wurde mit einem Score von 709 über TMPred (HOFMAN et al., 1993) und predictprotein (ROST et al., 1996) prognostiziert. Ein Score von über 500 gilt als signifikant. Die Genauigkeit dieses Programms liegt zwischen 80 und 95 %. Der N-Terminus und die in der Mitte positionierte Motor-Domäne liegen intrazytoplasmatisch oder nukleär. Ein hydrophobes Segment im Bereich der Aminosäuren 507-527 wahrscheinlich einer Transmembranhelix entsprechend mit einer Orientierung von intra- nach extrazellulär angegeben, deuten auf einen extrazellulären C-Terminus.

Über die PSORT II Datenbank wurde über den k-nearest neighbor classifier die Hauptlokalisation von Kinesin mit einer Wahrscheinlichkeit von 65,2 % als nukleär angegeben, mit 30,4 % zytoplasmatisch und 4,3 % mitochondrial (HORTON et al., 1997). Kinesin zählt nach Literaturvergleichen zu den DNA-bindenden und Mikrotubuli-assoziierten intrazellulären Proteinen mit vorwiegend nukleärer Lokalisation (HIROKAWA et al., 1998). Die Suche in der PSORT II Datenbank ergab zudem zwei Motive von je vier Aminosäuren in Position 162 (ArgLysLysLys) und 219 (LysArgLysPro), die jeweils ein nukleäres Lokalisationssignal darstellen. Solche Signale finden sich auch in nukleären Proteinen wie p53 und c-abl und tax-dependent-enhancer of HTLV-1-bindende Proteine (YOSHIMURA et al., 1990).

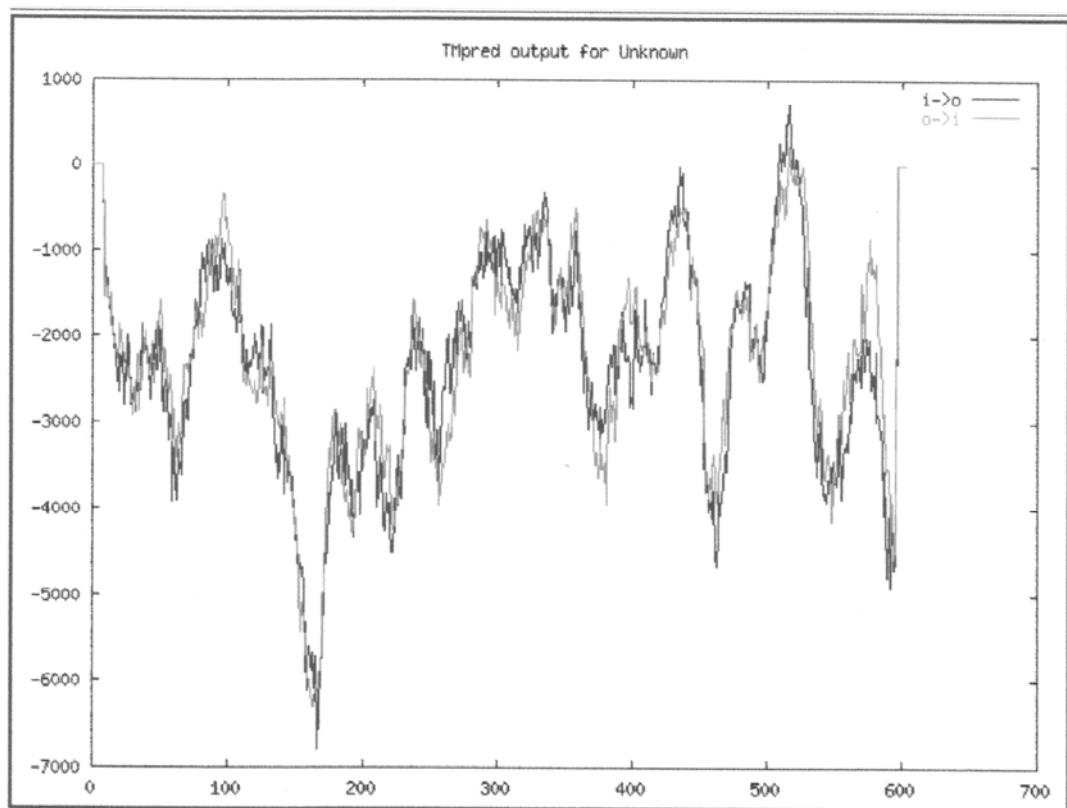


Abb. 5: Hydrophobizitätsprofil für sub T 25 Kinesin. Zu erkennen ist das hydrophobe Segment (AS 507-527) im C-terminalen Bereich mit einer präferenziellen Orientierung von intra- nach extrazellulär. Die N-terminalen 506 AS liegen intrazellulär bzw. zytoplasmatisch. Das Carboxylende ist demzufolge extrazellulär lokalisiert.

### Strukturanalyse über die PROSITE-Datenbank und PSORT II

Bei der Suche in den Datenbanken (PROSITE (BAIROCH et al., 1997); PSORT II (HORTON et al., 1997); SYFPEITHI; PDB (ROST et al., 1996) usw.) wurden nur signifikante Motive berücksichtigt. Dazu sei auch auf CASP (kritische Beurteilung von Strukturvorhersagen verwiesen).

Tab. 2 : Hinweise auf **signifikante Motive für sub T 25** aus der **PROSITE-Datenbank**

<b>Motiv</b>	<b>Position Aminosäure</b>
Leucin-Zipper Motiv (LANDSCHULZ et al., 1988)	<b>645</b> LEQKIDALTEIQKKLKLLADL
N-Glykosylierung N-(P)-(ST)-(P) (PLESS et al., 1977)	<b>123</b> NQTA <b>261</b> NQTF + 3 weitere
cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase- Phosphorylierung (FERAMISCO et al., 1980)	<b>145</b> KKSS
Proteinkinase C-Phosphorylierung (KISHIMOTO et al., 1985)	<b>37</b> SDK <b>200</b> SSK <b>229</b> TLK + 8 weitere
Kaseinkinase II-Phosphorylierung (PINNA et al., 1990)	<b>204</b> SVLE <b>229</b> TLKD + 7 weitere
Tyrosinkinase-Phosphorylierung (HUNTER et al., 1982; BLOM et al., 1999)	<b>250</b> KQKVDLTRY + 2 weitere
N-Myristoylierung (TOWLER et al., 1988)	<b>29</b> GIYAAI + 8 weitere
Amidierung (KREIL et al., 1984)	<b>67</b> KGKK
ATP/GTP - bindendes Motiv A (P-loop) (WALKER et al., 1982)	<b>303</b> GQTRSGKT
Kinesin-Motor-Domänen-Signatur (ENDOW et al., 1991)	<b>441</b> GKFSLVDLAGNE
Prokaryotisches Membran-Lipoprotein-Lipid Attachement Motiv (VON HEINJE et al., 1989)	<b>517</b> IATISPGMTSC
Glykosaminoglykan attachement site (HASSEL et al., 1986)	<b>612</b> SGKG

Die Klone sub T 25 RACE und Kinesin NYD-KIF2 haben in dem Produktbereich der Aminosäuren 1-267 alle Motive außer den aufgeführten Veränderungen gemeinsam.

Die Kinesin-Motor-Domäne erstreckt sich typischerweise über einen Bereich von über 330 Aminosäuren, hier über die Aminosäuren 219-547, und findet sich in ähnlicher Struktur in verwandten Kinesinproteinen (human CENP-E, human mitotic kinesin-like-protein-1), welche eine essentielle Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion und Zelldivision erfüllen (MANEY et al., 1998).

Fünf Motive für N-Glykosylierungen verteilen sich über die ganze Sequenz. Eines befindet sich im N-terminalen Abschnitt und drei in der Kinesin-Motor-Domäne, sowie eines in räumlicher Nähe zum transmembranen Bereich der Motor-Domäne bzw. innerhalb der Helix.

Die Aminosäuresequenz enthält weiter 23 Phosphorylierungsmotive für Proteinkinase C (KISHIMOTO et al, 1985) , Caseinkinase II (PINNA et al., 1990), Tyrosinkinase (HUNTER et al., 1982) und zusätzlich im Klon sub T 25 RACE resultierend aus dem Aminosäureaustausch in Position 148 eine cAMP-abhängige Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase (FERAMISCO et al., 1980). Caseinkinase II (CK2) ist ein an der Phosphorylierung nukleärer Proteine beteiligtes Enzym.

Der intrazelluläre Teil enthält insgesamt neun Phosphorylierungsstellen für Protein Kinase C innerhalb und außerhalb der Motor-Domäne, sechs Casein-Kinase II-Phosphorylierungsmotive, zwei Phospho-Sites für Tyrosinkinase, sieben N-Myristoylierungs-Motive (TOWLER et al., 1988) und eine Amidierungsstelle (KREIL et al., 1984).

Extrazellulär liegen zwei Phosphorylierungs-Motive für Protein Kinase C und Tyrosinkinase und eine Glykosaminoglykanattachment-Site (HASSEL et al., 1986), sowie eines für Caseinkinase II transmembranär und zwei N-Myristoylierungsmotive. Im Bereich der Transmembranhelix (507-527) findet sich von 517-527 ein Prokaryotisches-Membran-Lipoprotein-Lipid-Attachment-Motiv (VON HEIJNE et al., 1989).

Ebenfalls extrazellulär im Bereich 645-666 liegt eine Leucin-Zipper-Domäne (LANDSCHULZ et al., 1988). Das Leucin-Zipper-Muster ist präsent in vielen eukaryontischen genregulatorischen und DNA-bindenden Proteinen, wie den C-myc- und L-myc-Onkogenen und zahlreichen Transkriptionsfaktoren..

Unter Berücksichtigung der Nukleotidabweichungen und assoziierten Aminosäureaustausche im Klon sub T 25 kommt es zu folgenden Motivveränderungen im ORF von 267 Aminosäuren:

An Position 29-34 geht ein N-Myristoylierungs-(MYRISTYL)-Motiv verloren. Solche Motive bilden einen Lipid-Anker, der eine Bindung zwischen Protein und Lipid ermöglicht (TOWLER et



al., 1988).

An Position 261-264 geht ein N-(ASN)-Glykosylierungs-Motiv verloren.

Ein neues Motiv, eine cAMP- und cGMP-abhängige (CAMP)-Proteinkinase-A-Phosphorylierungsseite ergibt sich im Klon sub T 25 im Bereich 145-148.

So finden sich im Klon sub T 25 noch insgesamt ein N-Glykosylierungsmotiv, eine Amidierungsseite und sieben Konsensusmotive für die Phosphorylierung durch die vier genannten Kinasen (PKC, CK2, TYR, CAMP).

### Expressionsuntersuchungen per RT-PCR und Northern Blot für sub T 25

Eine RT-PCR-Expressionsanalyse für den RACE-Klon zeigte für Testis, hochgenomische DNA und Negativkontrollen eine Bande in Testis und hochgenomischer DNA auf gleicher Höhe. Die weitere BLAST-Recherche über blast/hgs zeigte, daß der RACE-Klon sub T 25 aus einem einzigen Exon besteht ohne Introns.

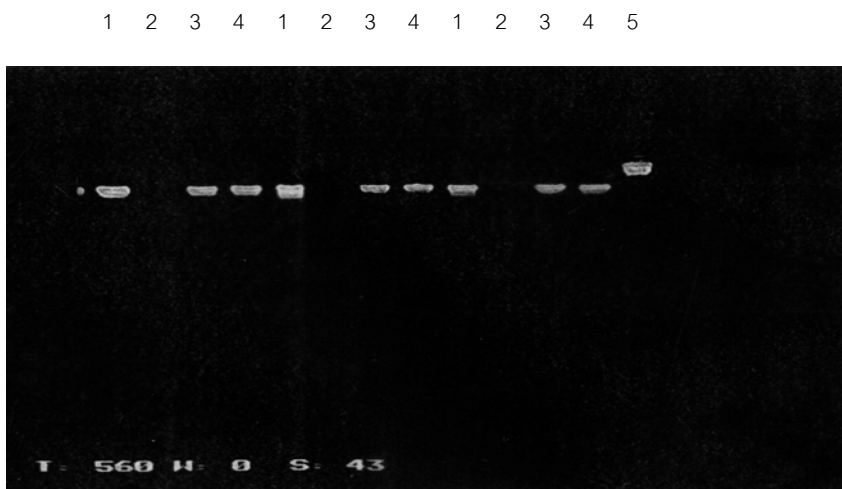


Abb. 6: Etablierungs-RT-PCR für sub T 25 RACE : 1 Testis 2 Negativkontrolle 3 Hochgenomische DNA 4 Hochgenomische DNA bei 60 ° C, 63 ° C und 66 ° C und 5 LST = Längenstandard. Das Foto zeigt, dass mittels RT-PCR keine Aussage zur Expression gemacht werden kann.

Für die Untersuchung der Expression von sub T 25 RACE wurden zwischen 10 µg und 20 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Hybridisierungen wurden zunächst mit dem Ursprungsinser sub T 25 von 230 bp durchgeführt. Die Testisspezifität von sub T 25 konnte vielfach bestätigt werden. Eine Expression in Normalgeweben konnte nicht nachgewiesen werden. Für die Sonde sub T 25-230 bp-cDNA konnte eine testisspezifische Expression bei drei verschiedenen

Transkriptlängen von ca. 800, 1800 bp und 2400 bp detektiert werden.

Eine einmalig prominentere Expression in einem Hodentumor auf gleicher Höhe bei 1800 bp wurde nicht densitometrisch überprüft. Im Hodentumor sind die Banden von gleicher Prominenz wie in Testis-Normalgewebe, so dass quantitativ betrachtet eine Überexpression hier ausgeschlossen scheint. Für Testis und den Hodentumor zeigte sich einmal noch eine Expression bei ca. 2400 bp, dem Volllängetranskript von humanem Kinesin entsprechend.

Weiter wurde eine deutliche Überexpression in zunächst einem Bronchialkarzinom bei ca. 1800 bp bestimmt. Histologisch handelt es sich hier um ein undifferenziertes relativ kleinzelliges Karzinom vom Karzinoidtyp mit fokaler neuroendokriner Differenzierung. Immunhistochemisch exprimiert das Karzinom herdförmig Chromogranin, Serotonin negativ. Die Gamma-Enolase zeigt eine wechselnd ausgeprägte, teils zytoplasmatische, teils nukleäre Färbung, die überwiegend als unspezifisch angesehen wurde. Das Tumorstadium entsprach pT1N0Mx G III.

Im folgenden sind die Northern Blots für Testis und Normalgewebe abgebildet. Die vier Blots wurden über Autoradiographie ausgewertet:

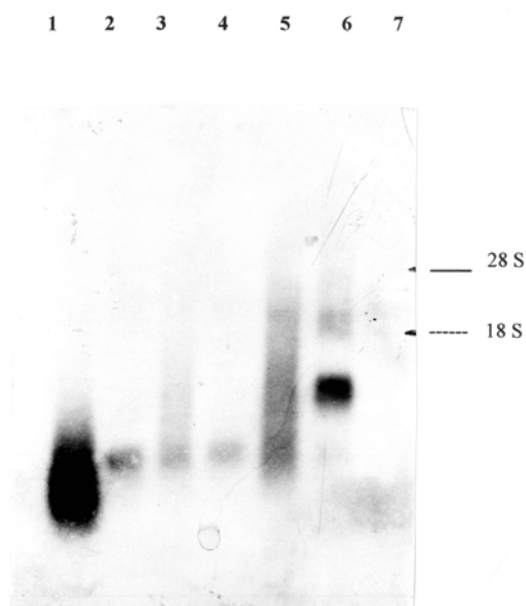


Abb. 7 : Northern Blot mit 32 P markierter sub T 25-230-bp-cDNA-Sonde aus Testis und Normalgeweben: 1 Leber 2 Lunge 3 Colon 4 PBL 5 Niere **6 Testis** 7 Magen. Es imponieren 2 Banden in Testis bei **0,8 kb** und **1,8 kb**. 0,8 kB-Bande scheint prominenter. Die beiden Transkriptlängen weichen von dem Volllänge kinesin-Transkript von 2,4 kb ab. Eine Splice-Variante kann bei der über Sequenzanalyse und RT-PCR bekannten intronlosen Struktur von sub T 25 ausgeschlossen werden.

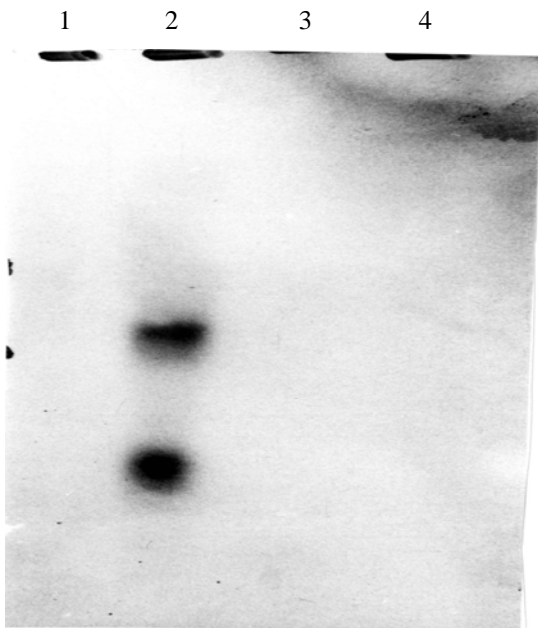


Abb. 8: Northern Blot mit der gleichen Sonde für 1 PBL 2 **Testis** 3 Nieren-CA (RCC) 4 Niere. Spezifische Expression bei **0,8 kb** und **1,8 kb** nur in Testis.

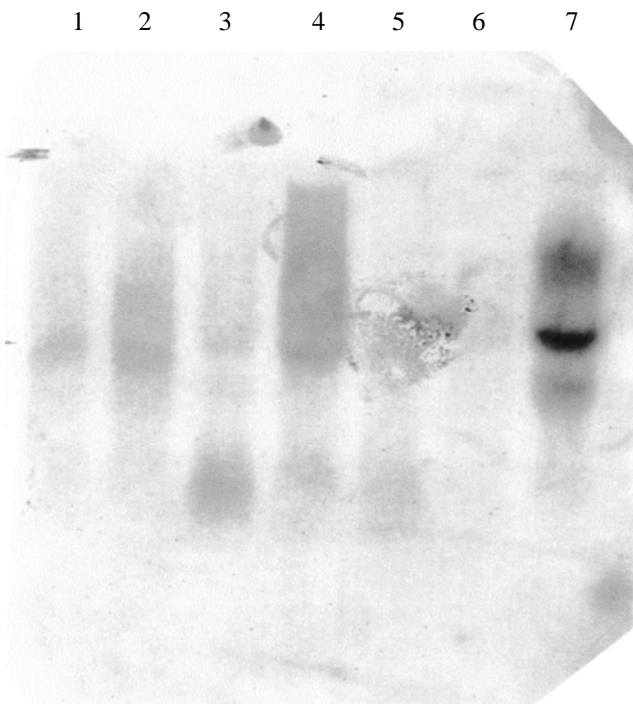


Abb. 9: Northern Blot mit  $^{32}\text{P}$  markierter sub T 25-cDNA-Sonde für Testis und Tumoren: 1 **Testis** 2 **Parathyroid Tumor** 3 Bronchial-CA 700 4 **Hodentumor** 5 LK Magen-Früh-CA 6 **Ovarial-CA** 7 **Bronchial-CA 657**. Schwache Banden sind bei **1,8 kb** in 1, 2 und 4 zu detektieren. Eine deutliche **Überexpression** findet sich in Lane 7 **Bronchial-CA 657** bei **1,8-2,0 kb**.

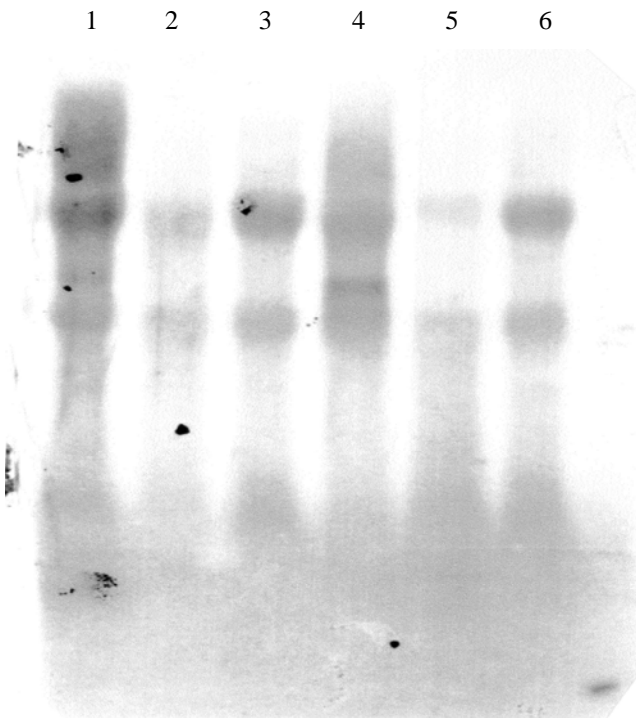


Abb. 10: Northern Blot mit gleicher Sonde für Testis und die gleichen Tumoren wie in Abb. 9: **1 Testis** 2 Parathyroid Tumor 3 Bronchial-CA 700 **4 Hodentumor** 5 LK Magen-Früh-CA 6 Bronchial-CA 700. Spezifische Banden bei **1,8 kb** in Testis und Hodentumor.

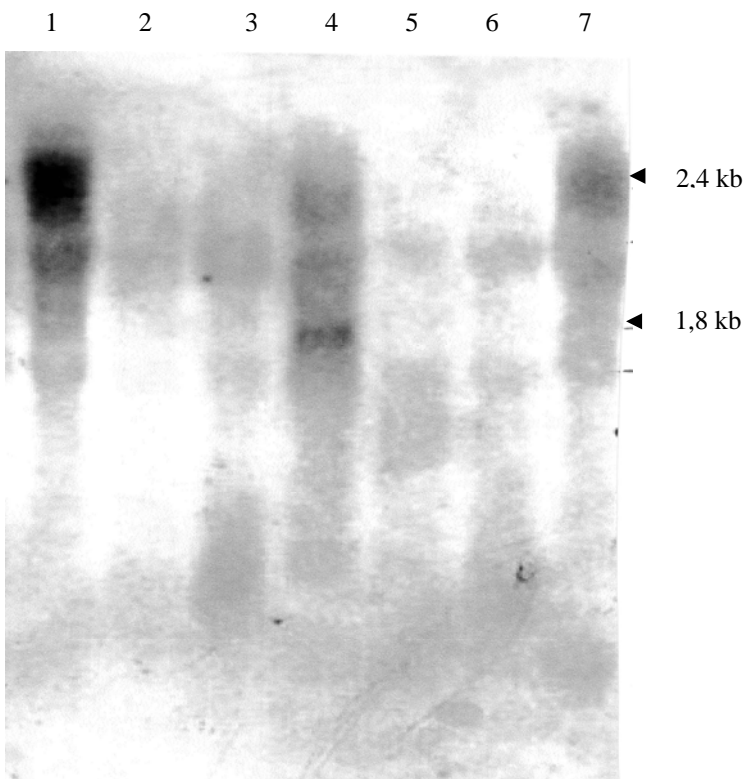


Abb. 11: Northern Blot mit gleicher Sonde: **1 Testis** 2 Parathyroidtumor 3 Bronchial-CA 700 **4 Hodentumor** 5 LK Magen-Früh-CA 6 Bronchial-CA 700 **7 Testis**. In Hodentumor Lane 4 und Testis Lane 1 und 7 finden sich spezifische Signale bei jeweils **1,8 kb** und **2,4 kb**, dem **Volllänge kinesin** entsprechend.

Die Hybridisierung in einem breiteren Tumorspektrum mit insgesamt 75 Tumoren 20 verschiedener Entitäten wurde mit dem RACE-Klon sub T 25 durchgeführt und zeigte eine weitere Expression in einem zweiten Bronchialkarzinom ebenfalls bei 1,8 kb. Bei dem Einsatz von bedeutend weniger RNA (ca. 8-10 ug) zeigt sich die Bande im Vergleich zu Testis (20 ug) als gleich prominent.

Das zweite Bronchialkarzinom ist histologisch ein mäßig differenziertes Plattenepithelkarzinom Tumorstadium pT2N1Mx G II. Dieses Gewebe wurde im Rahmen eines anderen Projektes zuvor auf die Expression von bekannten Cancer-Germline-Antigenen untersucht. Dabei wurde eine Co-Expression von NY-ESO-1 und SSX-4 nachgewiesen, keine Expression von SCP1 und SSX-2. Der HLA-Status ist A2+/A3-.

Die folgenden sechs abgebildeten Northern Blot- „large-scale“- Analysen wurden mittels Phosphorscreen ausgewertet. Die Hybridisierungen wurden mit dem RACE-Klon als Sonde durchgeführt. Darunter die  $\beta$ -Aktin-Hybridisierungen mit einem Transkript zwischen 1,8 – 2,1 kb.

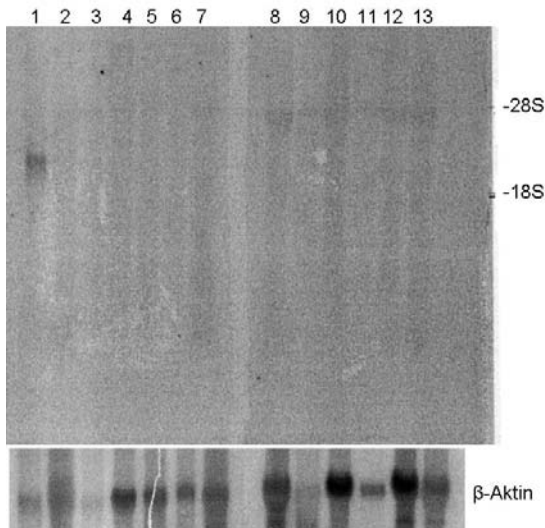


Abb. 12 : Northern Blot Analyse TB 1 mit einer 32 P markierten sub T 25-RACE-cDNA-Probe für Testis und Tumoren demonstriert eine testisspezifische Expression bei einer Transkriptlänge von 1,8 kb. Lanes **1 Testis** 2 Lymphom 3 B-Zell-Lymphom 4 RCC 5 Blasen-CA 6 Leiomyosarkom 7 Magen-CA 8 Endometrium-CA 9 Ovarial-CA 10 LK Mamma-CA 11 Mamma-CA 12 Colon-CA 13 Uterus-CA. Positive Expression durch Fettdruck hervorgehoben. In den unterstrichenen Tumoren kann eine Expression aufgrund zu schwacher Banden in der  $\beta$ -Aktin-Kontrolle nicht beurteilt werden, bzw. nicht ausgeschlossen werden. Diese Kennzeichnung gilt auch für die nachfolgenden Blots.

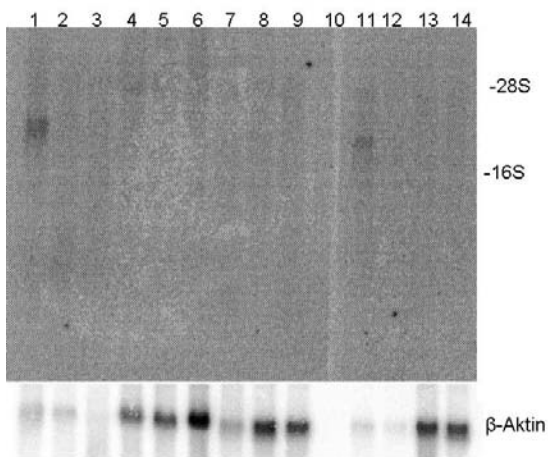


Abb. 13. : Northern Blot Analyse TB 2 mit einer  $^{32}P$  markierten sub T 25-RACE-cDNA-Probe für Testis und Tumoren demonstriert neben der Expression in Testis bei 1,8 kb eine Expression gleicher Prominenz in Lane 11 Bronchial-CA bei 1,8 kb. Im Hinblick auf die geringere RNA-Menge bei der Blotherstellung in Lane 11 Bronchial-CA kann bei gleicher Stärke der detektierten Banden in Lane 11 eine Überexpression diskutiert werden. Vergleiche dazu die Stärke der Banden der  $\beta$ -Aktin-Kontrollen. **1 Testis** 2 Magen-NHL 3 Mamma-CA 4 Ovarial-CA 5 Hepatozelluläres Karzinom 6 Pankreas-CA 7 Ovarial-CA 8 Bronchial-CA P 1041 9 Bronchial-CA P 1040 10 geschnitten **11 Bronchial-CA P 1048** 12 Gliom NC 1 13 Gliom NC 2 14 Gliom NC 3

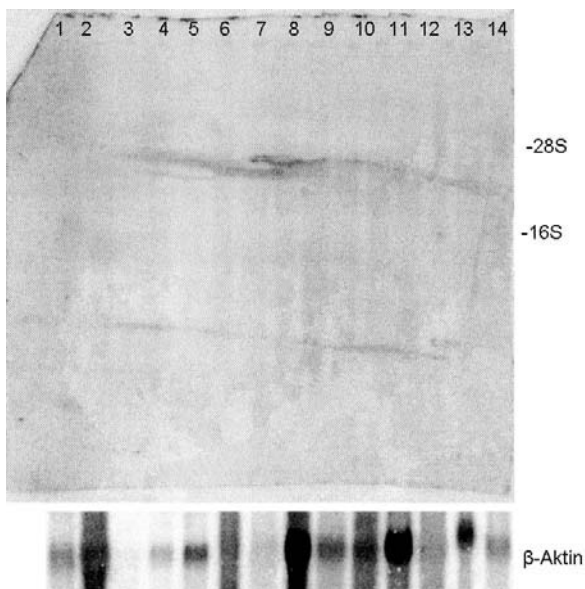


Abb. 14: Tumorblot TB 3 **1 Testis** 2 Myometrium-CA 3 Mamma-CA 4 Mamma-CA 5 Kolorektal-CA 6 Ovarial-CA 7 Endometrium-CA 8 Mamma-CA 9 Endometrium-CA 10 Rektum-CA 11 Ovarial-CA 12 Ovarial-CA 13 Colon-CA 14 Leberfiliae . Spezifische Bande bei 1,8 kb in Testis Lane 1.

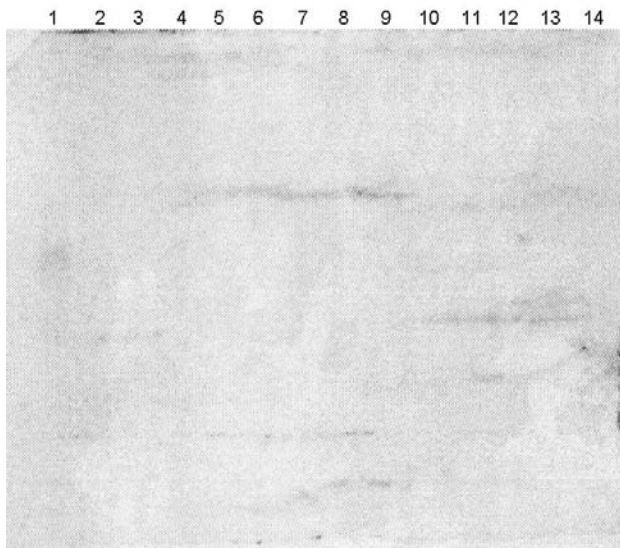


Abb. 15: Tumorblot TB 4 **1 Testis** 2 693 3 Bronchial-CA P 1047 4 Bronchial-CA P 1047 5 Mamma-CA 6 Nieren-CA 7 Nieren-CA 8 Milz-Lymphom 9 Leberfiliae 10-14 Bronchialkarzinome. Spezifische Bande in Testis bei 1,8 kb in Lane 1. Keine  $\beta$ -Aktin-Kontrolle.

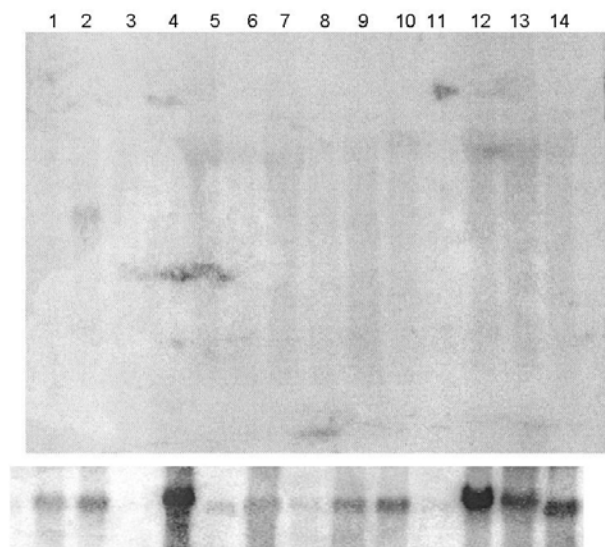


Abb. 16: Tumorblot TB 5 **1 frei** **2 Testis** 3 Nieren-CA 4 Leiomyosarkom 5 Lymphom 6 Nieren-CA 7 Kolorektal-CA 8 T-Zell-NHL 9 Leberfiliae 10 RCC 11 Lebertumor 12 Mamma-CA 13 Ovarial-CA 14 Colon-CA. Spezifische Bande in Testis bei 1,8 kb in Lane 2.

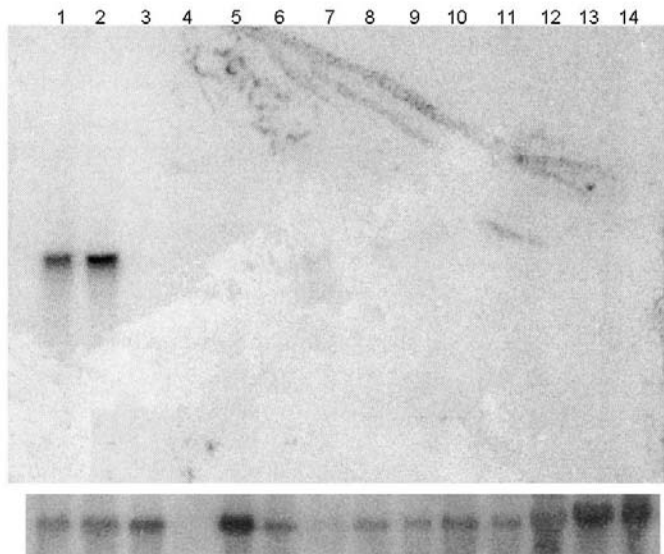


Abb. 17: Tumorblot TB 6: **1 Testis 2 Testis** 3 Bronchial-CA P 1044 4 Bronchial-CA P 1045 5 Bronchial-CA P 1046 6 Bronchial-CA P 1047 7 Bronchial-CA P 1048 (Rest 4 ug RNA) 8 Bronchial-CA P 1031 9 Bronchial-CA P 1031 10 Colon-CA 11 Magen-CA 12 Ovarial-CA 13 LK Mamma-CA 14 Mamma-CA. In Lane 1 und Lane 2 bestätigt sich wiederum die spezifische 1,8 kb-Bande in Testis.



Tabelle 3 : **Tumorgewebe, die auf die Expression von sub T 25 untersucht wurden**

<b>Tumor-Typ</b>	<b>positiv</b>	<b>getestet</b>
Lymphome	0	4
Gliome	0	3
<b>Bronchialkarzinome (NSCLS Und SCLS)</b>	<b>2</b>	<b>10</b>
<b>Parathyroidtumoren</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Testis-Tumoren</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Prostatakarzinome	0	1
Ovarialkarzinome	0	12
Uteruskarzinome	0	5
Mammakarzinome	0	9
Lymphknoten Mammakarzinom	0	2
Magenkarzinome	0	2
Lymphknoten Magenkarzinom	0	1
Magen-NHL	0	1
Kolorektalkarzinome	0	8
Leberfiliae (Colon-CA)	0	2
Hepatozelluläres Karzinom	0	1
Pankreaskarzinome	0	1
Nierenkarzinome (RCC)	0	8
Blasenkarzinome	0	1
Leiomyosarkom	0	2

Ingesamt waren 4/75 Tumoren sub T 25-positiv, darunter eine Expression von 20 % in Bronchialkarzinomen. Für ein positives Bronchialkarzinom war eine Expression von NY-ESO-1 und SSX-4 bekannt. Die Tumoren waren unterschiedlichen histologischen Typs und stammten von verschiedenen Patienten.

### Chromosomale Lokalisation

Die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation erfolgte über Unigene und zeigte die Lage auf Chromosom 17q22. Damit weicht sub T 25 Kinesin von einigen bekannten Cancer-Germline-Antigenen ab, die häufig, jedoch nicht immer auf dem X-Chromosom liegen. SCP-1 bildet z. B. eine bekannte Ausnahme auf Chromosom 1.

### Überprüfung der Antikörperreaktion

Eine Klonierung in einen Expressionsvektor (pQE30) und die Herstellung von Protein wurden versucht: Der Western Blot zeigte nach Färbung mit His-tag-Antikörpern neben unspezifischen Banden im 8 %igen SDS-Gel kein Produkt in Höhe des errechneten Molekulargewichtes (kDa). Der Immunoblot mit Normal- und Tumorerum zeigte ebenfalls keine Reaktion, so dass hinsichtlich der Antikörperreaktion und der Immunogenität keine experimentell belegbare Aussage gemacht werden kann.

## **IV.5. Der Klon sub T 37**

### Sequenzanalyse für Klon sub T 37

Bei diesem Klon handelt es sich aufgrund der Datenlage um ein synthetisches Konstrukt aus mehreren voneinander unabhängigen Inserts, das im Rahmen von Klonierungsartefakten entstanden sein muss. Sub T 37 lieferte nach dem EcoRI-Verdau 5 Fragmente unterschiedlicher Länge, woraus sich 4 EcoRI-Schnittstellen ableiten ließen. Es handelte sich dabei um Fragmente von ca. 894 bp, 361 bp, 310 bp, 152 bp und 88 bp. In den meisten Fällen war der Verdau unvollständig, so dass nur 4 oder 3 Fragmente von ca. 894 bp, 513 bp, 310 bp und 88 bp oder 894 bp, 601 bp und 310 bp imponierten. Insgesamt resultierte daraus eine maximale Fragmentlänge/Insertlänge von ca. 1805 bp. Ein Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HaeIII verdauten sowohl das Plasmid (Vektor) als auch das 894-bp-Fragment in 2 Fragmente, ebenso ein Verdau mit EcoRI und PvuII.

Eine Sequenzinformation war zunächst nur über vier Fragmente (361 bp + 152 bp + 88 bp = 601 bp und 310 bp) zu erhalten, von denen das 361 bp-Fragment, das 152 bp-Fragment und das 88 bp-Fragment zusammengesetzt ein partielles Transkript der kodierenden Sequenz für

X-box-binding protein XBP1 (1836 bp, 350 AS) darstellten, die in diesem Homologiebereich auch zwei EcoRI-Schnittstellen enthält. XBP1 wird ubiquitär exprimiert (LIOU et al., 1991) und gehört zu einer Leucine-zipper-Klasse von Proteinen, die an den HLA-DR alpha-Promotor binden (LIOU et al., 1990).

Die Datenbankanalysen ergaben, dass die Sequenz des 310 bp-Fragmentes eine Teilhomologie zu Kinesin-like-Protein aufwies und zu sub T 25.

Aufgrund seines Expressionsmusters erschien vor allem das 894 bp-Fragment interessant. Über das 894 bp-Fragment waren jedoch trotz mehrfacher Sequenzierung mit modifizierten Techniken (MIZUSAWA et al., 1986; TABOR et al., 1990) nur bruchstückhafte Sequenzinformationen zu erhalten, die streckenweise valide lesbar waren. Das 894 bp-Fragment zeigte über eine Länge von 220 bp ebenfalls eine Teilhomologie zu Kinesin-like-Protein (Chromosom 17q22), allerdings in einem anderen Sequenzbereich als das 310 bp Fragment. Weiter zeigte sich im Anschluß an diese Homologie zu Kinesin, über einen Bereich von 200 bp eine 100 %ige Homologie zu einem Abschnitt des MDM2 Onkogens, Exon und Intron 9, (376 bp) (Chromosom 12) (LIANG et al., 2004) und eine Teilhomologie zu HLA-B-Genen für MHC-Klasse-I-Antigene (Chromosom 6). Das MDM2 Onkogen wird unkontrolliert amplifiziert und überexprimiert in vielen humanen Tumoren (ZHANG et al., 2000). In der Mitte der Sequenz fand sich über einen Basenbereich von 50 bp eine 100 %ige Homologie zu dem Breast and Ovarian Cancer Suszeptibilitäts BRCA 1 Gen, Exon 2 (Chromosom 17q21), (MITELMAN et al., 1997). Bei einer Länge dieses Exons des BRCA 1 Gens von 1338 bp ist diese Übereinstimmung mathematisch betrachtet nicht signifikant. Das BRCA 1 Gen ist ein ubiquitär auftretendes Tumorsuppressorgen, das bei einer Mutation onkogene Potenz freisetzt und so eine Rolle bei der Entstehung von Ovarial- und Mammakarzinomen innehat (REYNOLDS et al., 2001).

Überlappende Sequenzen, die die Fragmente hätten eindeutig einander zuordnen können, konnten aufgrund der Sequenzqualität nicht ermittelt werden. Es fanden sich eingestreute Vektorsequenzen über kurze Strecken inmitten der Sequenzbruchstücke.

#### Expressionsmuster des Klons sub T 37

Die RT-PCR lieferte keine verwertbaren Ergebnisse, zumal aufgrund der Sequenzlücken keine valide Primerauswahl getroffen werden konnte. Eine RACE-PCR konnte demzufolge auch nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Die Northern Blot Analyse zeigte folgendes Expressionsmuster: Die Hybridisierungen wurden alle mit dem 894 bp-Fragment durchgeführt, das zu dem MDM2-Onkogen teilhomolog ist. So imponierte im Northern Blot für Testis und Normalgewebe lediglich eine Bande in Testis bei ca. 1700 bp.

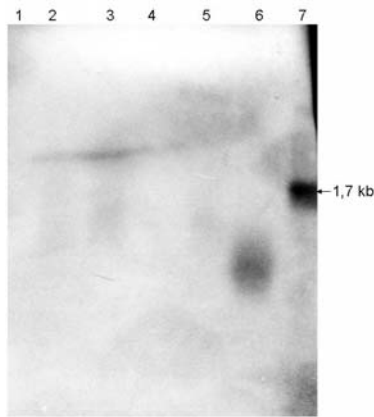


Abb. 19 Northern Blot für Testis und Normalgewebe. Hybridisierung mit sub T 37-894bp-cDNA-Sonde. 1 Haut 2 frei 3 frei 4 Lunge 5 PBL 6 Leber 7 **Testis**. Expression in Testis bei 1,7 kb. Expression in Normalgeweben 0/4. Der Blot war GAPDH-kontrolliert.

Drei verschiedene Northern Blot Analysen für Tumoren ergaben jeweils das gleiche Expressionsmuster und zeigten eine Expression in allen getesteten Tumoren

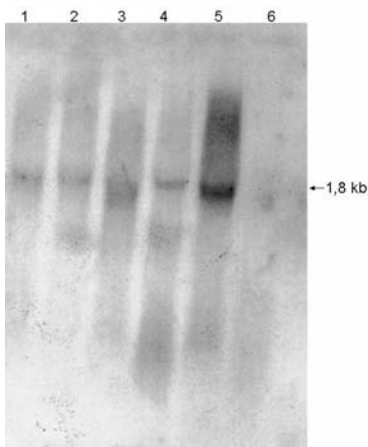


Abb. 20: Tumorbplot T 13 für Klon sub T 37 und 894bp-cDNA-Sonde. **1 Testis 2 Testis 3 Parathyroid Tumor 4 Bronchialkarzinom 700 5 Hodentumor** 6 Lymphknoten Magen-Früh-Karzinom. Expression in beiden Testis Proben in Lane 1 und 2. Expression auf gleichem Level in allen getesteten Tumoren 3/3 in Lane 3, 4 und 5. Keine Expression in Normalgewebe LK Magen-Früh-CA in Lane 6. Dies spricht für eine tumorspezifische Expression. Keine  $\beta$ -Aktin- oder GAPDH-Kontrolle.

### Chromosomale Lokalisation von sub T 37

Das hier vorliegende Kinesin und das BRCA 1 Gen sind beide auf Chromosom 17 lokalisiert. Kinesin auf 17q22 und BRCA 1 auf 17q21 (MITELMAN et al., 1997). X-box-binding-Protein ist hingegen auf Chromosom 22 lokalisiert und es existiert ein Pseudogen auf Chromosom 5 (LIOU et al., 1991). Das MDM2 Gen stammt von Chromosom 12 und die MHC-Klasse-I-Moleküle werden von Chromosom 6 kodiert.

### **IV.6. Der Klon sub T 39**

#### Sequenzanalyse von sub T 39

Der Klon Sub T 39 besteht aus einem 314 bp langen Fragment. Der Homologievergleich zeigte zunächst in blast n/nr und blast x/nr keine Homologie. In blast n/dbest zeigte sich eine Homologie zu Human gene signature HUMGS 0006821 (ACC.No. C02325). Die RACE-Klonierung lieferte kein längeres Transkript. Es blieb bei exakt 314 bp. Daraufhin wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Kurz später fand sich über blast n/nr in antisense-Orientierung im Bereich der Nukleotide 30-264 eine 100%ige Homologie zu den Basen 48-282 der mRNA von Prostaglandin-Endoperoxid-H-Synthase-1, 3'UTR (907 bp) (PLANT et al., 1999), die Teil eines Klon-Contigs Klon RP11-542K23 auf Chromosom 9 ist und die aus einer Megakaryoblasten-Zelllinie isoliert wurde. Bei diesem Enzym PGHS-1 handelt es sich um ein erst kürzlich charakterisiertes neues Transkript mit einem gewebespezifischen Expressionsmuster. Identifiziert wurden bislang zwei Isoformen PGHS-1 und PGHS-2, die von verschiedenen Genen kodiert werden. PGHS-1 ist dabei auf Chromosom 9 und PGHS-2 auf Chromosom 1 lokalisiert. Die im Klon sub T 39 vorliegende Isoform PGHS-1 wird als „housekeeping gene“ diskutiert und Literaturangaben sowie den hier vorliegenden Expressionsanalysen zufolge auch in Normalgeweben bzw. ubiquitär exprimiert (PLANT et al., 1999).

#### Expressionsanalyse von sub T 39 per RT-PCR und Northern Blot

Eine RT-PCR war hier auch nicht für das RACE-Transkript durchführbar, da auch dieser Klon keine Introns enthielt, wie der Vergleich über Blast/hgs zeigte.

11 Tumoren und 9 Normalgewebe zeigten in Übereinstimmung zu den Literaturangaben mit multiplen oder einzelnen Banden in jedem Gewebe eine Bande als Hinweis auf eine ubiquitäre

Expression (1 Testis 2 Parathyroid Tumor 3 Bronchial-CA 4 Hodentumor 5 LK Magen-Früh-CA 6 Mamma-CA 7 Ovarial-CA 8 Prostata-CA 9 Colon-CA 10 Nieren-CA 11 Testis 12 Hodentumor 13 Mamma-CA 14 Ovarial-CA Daten nicht gezeigt).

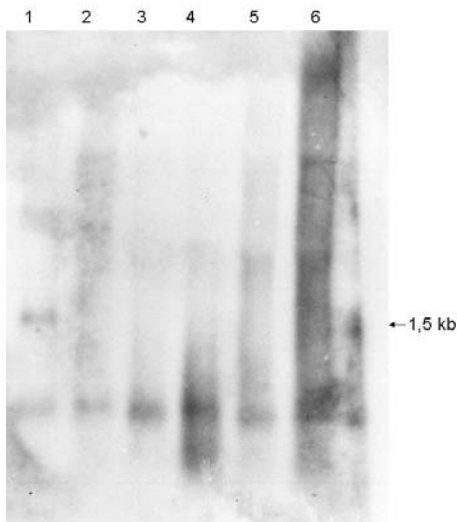


Abb. 21: Northern Blot für sub T 39 für Testis und Normalgewebe. 1 Testis 2 Niere 3 Magen 4 Lunge 5 Rektum 6 Milz. Deutliche Banden finden sich neben Testis auch in den anderen fünf Normalgeweben.

#### Chromosomale Lokalisation von sub T 39

Die chromosomale Lokalisation ergab sich über Unigene auf Chromosom 9 q32-q33.3.

#### **IV.7. Der Klon sub T 44**

##### Sequenzanalyse von sub T 44

Sub T 44, ein 665 bp langes Fragment, zeigte im BLAST-Homologievergleich außer einer Sequenzübereinstimmung mit einem Lungencarcinoid signifikante Homologien ausschliesslich zu Tumoren.

Die RACE-Klonierung ergab eine mRNA von 710 Basen, also 100 Basen länger als der Ausgangsklon. Aus erneuter d/best Analyse ergaben sich neben den zuvor beschriebenen Tumorhomologien zu Lungenkarzinoiden, Nerventumoren, kleinzelligen Lungenkarzinomen und Parathyroid-Tumoren, hohe Homologien zu Testis und auch zu differenzierten adulten

Normalgeweben wie Niere, Prostata und Gehirn (Hippocampus). Damit wird der Klon ubiquitär exprimiert und wurde nicht weiter untersucht.

#### Expressionsanalysen für sub T 44

Eine RT-PCR-Expressionsanalyse war auch hier aufgrund fehlender Introns nicht möglich.

Für sub T 44 ergab die Northern Blot Analyse eine spezifische Bande in Testis, keine in Normalgewebe und den getesteten Tumoren (Daten nicht gezeigt). Dies widerspricht den Sequenzergebnissen. Möglicherweise handelt es sich um eine low-level-Expression. Erneute Hybridisierungen mit einer größeren eingesetzten Gesamtmenge an RNA könnten darüber Aufschluss geben.

#### Chromosomale Lokalisation von sub T 44

Der Vergleich über BLAST ergab die Zugehörigkeit zu Chromosom 2.

## V. Diskussion

Unsere Suche konzentrierte sich zunächst darauf, neue und testisspezifische und dann möglichst auch tumorassoziierte Genprodukte zu finden. Eine systematische Sequenz-Analyse einer subtraktiven, also speziell für testisspezifische Transkripte angereicherten cDNA-Bank, erschien uns als vielversprechender Ausgangspunkt. Durch Expressions- und serologische Untersuchungen sollten im weiteren eine immunogene Funktion und eine mögliche Bedeutung als Tumorantigen erfasst werden. Im Vergleich zu den über das SEREX-Verfahren charakterisierten Antigenen versuchten wir hier den umgekehrten Ansatz („reverse tumor immunology“).

### V.1. Suche nach neuen Cancer-Germline-Antigenen und Analyse der Klone

Cancer-Germline-Antigene eignen sich durch ihr stabiles Expressionsmuster besonders gut als Zielantigene für immuntherapeutische Strategien, wie die Entwicklung monoklonaler Antikörper oder für Vakzinierungsstudien. Bei anderen tumorassoziierten Antigenen limitieren eine Downregulation von MHC-Klasse I-Molekülen einhergehend mit insuffizienter Prozessierung und Präsentation von Antigenen, wodurch generell die Angreifbarkeit maligner Zellen sinkt, sowie die Selektion nicht exprimierender Tumorzellsubklone, die therapeutische Anwendung (HERR et al., 1994; VAN DER BRUGGEN et al., 1991). Bei Herunterregulation ihrer MHC-Klasse-I-Expression müssen Tumorzellen zwar oft eine NK-Zellantwort in Kauf nehmen, was jedoch im Vergleich zu einer CTL-Antwort für die Tumorzelle vorteilhafter zu scheitern scheint (VAN DUINEN et al., 1988). Cancer-Germline-Antigene werden jedoch stabiler exprimiert. Viele Studien sprechen für die geschilderten Impfstrategien (z. B. JÄGER et al., 1998 und 2000; NEUMANN et al., 1998; LEE et al., 1999; PARK et al., 1999) und die Studienanzahl wächst. In klinischen Versuchsreihen oder in Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass tumorspezifische Vakzinierungen unter bestimmten Voraussetzungen zur temporären Regression oder zur Wachstumssuppression verschiedener invasiver Tumoren führen können (KAWAKAMI et al., 1996; OKADA et al., 2001).

Therapien nach diesem Prinzip weisen zwar verschiedene Limitationen auf. Auch die **Fas-Liganden-Expression** spielt beispielsweise eine limitierende Rolle (NIEHANS et al., 1997). Fas-Liganden (CD95-Liganden) werden neben ihrer vorbeschriebenen Expression in immunologisch privilegierten Regionen auch in einigen Tumoren exprimiert. Zytotoxische



T-Zellen können an diese Liganden binden und werden dabei zerstört. Die Expression von Fas-Liganden bei humanen Mammakarzinomen könnte so verantwortlich sein für die Hemmung von Antitumor-Immunantworten, durch die Assoziation mit der Apoptose von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) in vivo und der Destruktion von Fas-sensitiven lymphoiden Zellen in vitro (O'CONNELL et al., 1999).

Kritisch zu prüfen bleibt, dass gegen Tumorantigene gerichtete Effektorzellen je nach Expressionsmuster oder MHC-Restriktion HLA-abhängig auch Normalgewebe angreifen oder sogar **Autoimmunität** induzieren können (OVERWIJK et al., 1999). Die Immunisierung mit rekombinanten Vaccinia-Viren, die als Vektoren für das Differenzierungsantigen TRP-1 fungierten, führte so bei Mäusen mit B16 Melanomen neben der Rückbildung des Melanoms durch ADCC zu autoimmuner Destruktion nicht maligner Melanozyten und damit zu Vitiligo. Ähnliche Phänomene wurden auch bei Melanom-Patienten beobachtet (CUI et al., 1995). Spezifische CTL konnten nicht in den depigmentierten Mäusen bestimmt werden, aber hohe Titer von IgG anti-TRP-1-Antikörpern. Weitere Experimente mit „knockout“-Mäusen zeigten auch eine absolute Abhängigkeit von MHC-Klasse-II-Molekülen (nicht von MHC-Klasse-I) für die Induktion von Vitiligo. Bei Tumoren aus „nicht essentiellen“ Geweben (Melanozyten, Testis) wären diesen Untersuchungen zufolge, aber auch „Selbstreaktivität“ induzierende Impfstoffe auf Grundlage dieser Differenzierungsantigene denkbar (OVERWIJK et al., 1999).

Hingegen macht noch ein weiterer Aspekt Tumorantigene interessant. Die genetische Charakterisierung tumorspezifischer Antigene prädestiniert möglicherweise diese selbst oder die gegen sie gerichteten spezifischen Immunglobuline als **Tumormarker**. Die Tatsache, dass u. a. der AK-Titer korreliert mit der Tumorentwicklung bei NY-ESO-1 positiven Tumoren, bietet die Möglichkeit, mit Hilfe einer Titerbestimmung Tumordiagnostik zu betreiben oder Aussagen über Stadium und Prognose zu machen. Andererseits haben nur 10 % der Patienten mit NY-ESO-1 positiven Tumoren auch anti-NY-ESO-1-Antikörper. Dabei ist NY-ESO-1 das am meisten immunogene Antigen. Nach CHEUNG et al., 1997, kommt GAGE als Tumormarker bei Neuroblastomen in Frage. Desweiteren liegen Studien vor, bei denen B-Zell-Antworten gegen Tumoren mit einer schlechteren Prognose einhergehen, so beim Nachweis von Antikörpern gegen mutiertes p53 beim Mammakarzinom (SCHLICHTHOLZ et al., 1994). Inwieweit sich Antikörperantworten auf einzelne Tumorantigene oder die Tumorantigene selbst als Tumormarker eignen werden, bleibt abzuwarten.

In unserer Arbeit wurde für die Identifikation neuer Cancer-Germline-Antigene eine subtraktive Testis-cDNA-Bank verwendet. Das Interesse galt in erster Linie dieser speziellen Gruppe von

Tumorantigenen. Neue testisspezifische Transkripte sind deshalb attraktiv, weil sie mit ihrer auf Testis restringierten Expression das erste entscheidende Kriterium für ein Cancer-Germline-Antigen erfüllen. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Identifikationsmethoden, die Cancer-Germline-Antigene über CTL oder SEREX definierten, bestimmt hier nicht im Vordergrund die Immunogenität die Klonauswahl. Bei CTL und SEREX werden auch immunogene Strukturen anderer tumorassoziierter Antigene detektiert, die nicht zu den Cancer-Germline-Antigenen zählen. Beschrieben sind auch Reaktionen mit autoimmunreaktiven Proteinen. Auch können damit nicht im Vorfeld bereits bekannte, charakterisierte Transkripte ausgeschlossen werden. In der Hoffnung sich nur auf im engsten Sinne testisspezifische Klone zu konzentrieren, sollten in diesem Projekt über ein Sequenzscreening, einen Datenbankvergleich und Expressionsanalysen neue Testisklone gefunden werden und der Zusammenhang dieser oder bekannter Germlineantigene mit Tumoren hergestellt werden. Damit wäre das zweite Kriterium für ein Cancer-Germline-Antigen erfüllt. Optional sollten zum Nachweis der Immunogenität als drittem notwendigem Kriterium weitere Untersuchungen folgen.

Bei Genbankhomologien zu bereits beschriebenen Genprodukten war es oft bereits möglich einigen Klonen Identität und Funktion zuzuordnen. Ein Expressionsprofil liess sich über einen Datenbankvergleich mit funktionell unbekannten Genfragmenten mittels z. B. der EST-Bank (expressed sequene tag) abschätzen. Bei Klonen ohne signifikante Homologie schloss sich eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR und Northern Blot an.

Ein Teil der Klone erwies sich als ubiquitär exprimiert oder vorcharakterisiert. Einige der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Klone waren homolog zu Translationsprodukten, die in der Literatur als tumorassoziiert oder testisspezifisch beschrieben wurden.

Die Klone sub T1-16, sub T 30, sub T 40, sub T 47 zeigten zwar keine Homologien zu bekannten Genen, aber im d/best-Vergleich Hinweise auf eine ubiquitäre oder nicht restringierte Expression in Gehirn, fetaler Leber, fetaler Lunge, Life tech mouse embryo oder immunologisch bedeutsamen Normalgeweben wie Thymus.

Solche Klone eignen sich nur bedingt als Zielstruktur einer Immuntherapie, da dies zu Autoimmunität und damit zur Beeinträchtigung lebenswichtiger Organe führen kann. Der Thymus erfährt zwar nach heutigem Wissensstand eine zunehmende Involution mit zunehmendem Lebensalter und ist bereits bei jungen Erwachsenen stark zurückgebildet, doch nimmt dieses Organ als Ort der T-Lymphozyten-Prägung eine zentrale Stellung als Immunorgan ein. So könnten Antikörper gegen Thymusantigene möglicherweise zu einem

Immundefektsyndrom vom T-Zell-Typ führen (OVERWIJK et al., 1999). Eine ubiquitäre Expression oder eine Expression in Gehirn oder fetalen Geweben schließen bei einer restringierten oder einer low-level Expression eine Immuntherapie nicht grundsätzlich aus, so z. B. wenn die entsprechenden Antigene im Tumor überexprimiert werden. Auch zählt Gehirn zu den immunologisch privilegierten Regionen, die nicht zwangsläufig einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort im Sinne einer Selbstreaktivität betroffen sein müssen (SAHIN et al., 1995).

Da jedoch das Kriterium der Testisspezifität nicht erfüllt ist, waren sie nicht eigentliches Ziel der vorliegenden Arbeit.

Die Klone sub T 17, sub T 45 und sub T 50 ergaben neben Homologien zum Protamin 2-Gen und dem Homo sapiens hypothetical protein, welches in Teratokarzinomen (Genbank FLJ10704) und in Colon (Genbank FLJ20092) exprimiert wird, über BLAST n/dbest Homologien zu Testis, Retina, Uterus, Melanozyten, Tonsillen, B-Zell-Keimzentren und weiteren gepoolten Normalgeweben (Soares NSF F89W OT PA P), als Hinweis auf ubiquitäre Expression. Überwiegend fanden sich aber hochrepetitive ALU-Sequenzen. Diese gehören zu einer Familie verstreut liegender hochrepetitiver DNA. Die DNA nahezu aller Eukaryonten enthält Familien repetitiver Sequenzen, deren Länge je nach Art zwischen 130 und 300 Basenpaaren variiert. Sie können in vielen tausend Kopien im Genom vorliegen. So kann die in Säugern häufigste Familie, die sogenannte Alu-Familie mit ihren repetitiven Sequenzen ungefähr 300000 mal im Genom vertreten sein (NAVARRO et al., 1999). Die Alu-Familie trägt ihren Namen nach der in ihr vorkommenden AGCT-Sequenz, der Erkennungssequenz für das Alu-Restriktionsenzym. Ihre Klonierung und molekulare Analyse ergaben, dass jede repetitive Sequenz von direkten, 7 bis 10 Basenpaare langen Sequenzwiederholungen flankiert ist (CLAVERIE et al., 1994). Die Alu-Familie mit kurzen verstreut liegenden Sequenzelementen wird auch als „short interspersed nuclear elements“ (SINEs) bezeichnet. Die Alu-Wiederholungen finden sich etwa alle 4 kb im Genom. Häufig findet man die Alu-Sequenzen im Euchromatin, in nicht kodierenden Abschnitten von Genen, vor allem in Introns. Sie sind also oft in Primärtranskripten enthalten (QUENTIN et al., 1988). Funktionell ist nichts über die ALUs bekannt, man vermutet aber, dass die ungleiche Rekombination durch sie unterstützt wird. Es sind in der Alu-Familie Mitglieder aktiv transponierbarer Elemente beschrieben, die aktiv in andere Bereiche des Genoms springen. Sequenzähnlichkeiten sind vorhanden mit bekannten Genen von Transposons, die für Reverse Transkriptase kodieren, sowie für andere retrovirale Proteine (CLAVERIE et al., 1994; KERLAVAGE et al., 1995).

Diese Klone mussten demzufolge im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit als uninteressant angesehen werden und wurden nicht weiter analysiert.

Der Klon Sub T 38 war identisch zum kompletten Genom mitochondrieller DNA und zu ribosomaler RNA. Dies führten wir am ehesten auf eine Verunreinigung der subtraktiven Ausgangsbank oder auf eine ineffektive Ligation zurück.

Die in der vorliegenden Arbeit sequenzierten testisspezifischen Transkripte waren für uns bedeutsam, wegen ihrer Bestätigung der Testisspezifität und damit Bestätigung der Qualität der subtraktiven Testis-Ausgangsbank. Sie legen uns nahe, dass es sich bei der cDNA-Bank tatsächlich um einen testisspezifisch angereicherten cDNA-Pool handelt, der damit als zuverlässige und valide Basis für die Suche nach Cancer-Germline-Antigenen angesehen werden kann.

Die jedoch weitaus größere Anzahl isolierter zwar auch in Testis aber auch ubiquitär exprimierter Klone stellt die Subtraktivität der Bank wiederum in Frage. So werden viele Klone zwar in Testis exprimiert, aber ebenso in anderen Normalgeweben. Die Bank war einmal amplifiziert und wurde zu diesem Zeitpunkt bereits weiteren Projekten zugänglich gemacht.

Es zeigte sich aber schließlich, dass einige der hier gefundenen Klone eindeutig testisspezifisch und teilweise sogar auch tumorassoziiert waren.

So zeigte sich der Klon sub T 20 als partielles Transkript des Cathepsin L 2-Gens. Unstimmigkeiten im Homologieabgleich von 5 % werteten wir als Sequenzierungsartefakte aufgrund von Coterminationen.

Da es sich bei Cathepsin L 2 bereits um ein vorcharakterisiertes Protein handelt, das schon ausführlich bezüglich seiner Expression untersucht wurde und aufgrund seiner Thymusexpression immuntherapeutisch nicht verwertbar ist, wurde der Klon sub T 20 nicht weiter untersucht (SLOANE et al., 1981; CHAUHAN et al., 1991).

Die Testisspezifität der subtraktiven Bank wird allerdings durch dieses Ergebnis nahegelegt, da Cathepsin L 2, wie u. a. die Untersuchungen einer spanischen Arbeitsgruppe zeigten, Northern-Blot-Untersuchungen zufolge, spezifisch in Testis, kolorektalen Karzinomen und Mammakarzinomen exprimiert wird ( SANTAMARIA et al., 1998), womit auch ein tumorbiologischer Zusammenhang gegeben ist. Unser d/best-Datenbankvergleich mit der partiellen Sequenz bestätigte eine Expression in Kolonkarzinomen (NCI GCAP Co12 Homo sapiens cDNA Colon-CA).

Der Klon sub T 22 zeigte wie die Klone sub T 17, sub T 32 und sub T 55 signifikante Übereinstimmungen zum humanen Gen für Protamin 2. Bei Protamin handelt es sich um ein

basisches Protein, das in Testis als Äquivalent zu in anderen Geweben vorhandenen Histonproteinen verstanden wird (DOMENJOURD et al., 1991). Unser d/best-Vergleich bestätigte eine in Testis spezifische Expression (EST 96416). Da diese Klone oft teilweise zu Protamin homolog waren und daneben sowohl partielle ubiquitäre Transkripte als auch ALU-Sequenzen enthielten, wurden sie nicht weiter untersucht.

Der Klon sub T 24 ist identisch zum Klon DKFZ p43D0635, der laut Genbankinformation aus humanem adultem Testis isoliert wurde. In der Literatur beschriebene RT-PCR-Analysen deuten aber auf eine ubiquitäre und damit nicht testisspezifische Expression (POUSTKA et al., 1999). Dies steht in Übereinstimmung zu unserem Datenbankvergleich, der viele d/best-Homologien zu Normalgeweben (Colon) und Tumoren (RCC, metastasiertes Mamma-CA) aufwies.

Die Klone sub T 25, sub T 37, sub T 39 und sub T 44 zeigten initial keine Homologien und wurden deshalb einer Expressionsanalyse zugeführt. Im Verlauf des Humangenomprojektes wurden schliesslich auch zu diesen Klonen Homologien gefunden. Somit wurde es zunehmend unwahrscheinlicher, neue Genprodukte zu detektieren. Da es sich aber dennoch hinsichtlich der Fragestellung um zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig charakterisierte Transkripte handelte, insbesondere hinsichtlich ihrer Testis- und tumorassoziierten Expression, wurden weitere Analysen durchgeführt.

Wir vermuten, dass es sich bei dem Klon sub T 37 um ein Klonierungskonstrukt oder um die Subligation voneinander unabhängiger Inserts handelt. Der Klon Sub T 37 mit einer Expression in allen Tumoren schien zunächst interessant. Die Sequenzierung ergab 4 Inserts. Die tumorspezifische Expression nachzuweisen, gelang jedoch nur mit dem 894 bp-Fragment. Auch mit modifizierten Methoden gelang für dieses Fragment keine vollständige Sequenzierung. Einzelne signifikante Sequenzmotive waren streckenweise jedoch deutlich lesbar und zu identifizieren. Die hieraus erhaltenen Sequenzinformationen zeigten zumindest auch einen onkologischen oder immunbiologischen Zusammenhang.

So zeigte sub T 37 (894 bp) eine Homologie zu dem MDM2 Onkogen und XBP1.

XBP1 wird ubiquitär exprimiert und gehört zu einer Leucine-zipper-Klasse von Proteinen, die an den HLA-DR alpha-Promotor binden können ( LIOU et al., 1990). X-Box-Binding Protein wurde dabei als zellulärer Transkriptionsfaktor identifiziert, der über eine Bindung an ein Promotorelement (X-Box), u. a. die Regulation der MHC-Klasse-II-Gene beeinflusst. Dieses Protein enthält zwei Domänen für DNA-Bindung und Dimerisierung (Leucine-zipper). Eine hohe Homologie fand sich auch zu dem XBP1/TREB5 verwandten Hepatocarcinogenesis-related Transkriptionsfaktor der Ratte, der ebenfalls über ein Leucin-zipper Motiv in die Entwicklung

des hepatozellulären Karzinoms involviert ist (KISHIMOTO et al., 1996).

Das MDM2 Onkogen wird unkontrolliert amplifiziert und überexprimiert in vielen humanen Tumoren. Bei kontrollierter Amplifikation kommt es ubiquitär also auch in Testis vor. Interaktionen bestehen zwischen dem p53 Tumorsuppressorgen und dem MDM2 Onkogen, dessen Protein als negativer Regulator einen direkten Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung von p53 besitzt. Das Onkoprotein bewirkt über eine Bindung an p53 dessen Degradierung (ZHANG et al., 2000). Über eine Hemmung des MDM2 Onkogens zur Stabilisierung von p53 und über eine gezielte Unterbrechung der Interaktion zwischen dem MDM2 Onkogen und dem p53 Tumorsuppressorgen erhofft man sich therapeutische Möglichkeiten (PENG et al., 2001). So versuchte man bereits mittels Antisense-Oligonukleotiden die Expression von MDM2 zu stoppen oder über inhibierende Polypeptide, die an MDM2-p53-Domänen binden.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen mit dem 894bp-Fragment von sub T 37 waren alle Tumoren positiv. Dies steht in Übereinstimmung zur Literatur. Das im Klon sub T 37 im 894 bp-Fragment vorkommende Sequenzmotiv des MDM2 Onkogen (LIANG et al., 2000) kann dabei mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit für die vorliegenden Hybridisierungsergebnisse verantwortlich sein. Die Überexpression dieses bekannten Onkogens in vielen Tumoren ist ein in der Literatur vielfach beschriebenes Phänomen (PENG et al., 2001). Eine Überexpression konnte hier im Vergleich zu Testis jedoch nicht verifiziert werden. Auch eine low-level-Expression in Normalgeweben konnte nicht detektiert werden. Im Northern Blot zeigte sich hier nur eine Expression in Testis und Tumoren. Aufgrund der in der Literatur ebenfalls beschriebenen Immunogenität ist das MDM2 Onkogen bereits ein erprobtes Ziel immuntherapeutischer Bemühungen. Ein schon für MDM2 getesteter Ansatz ist die Gabe monoklonaler Antikörper. Die Herstellung von Impfstoffen gegen überexprimiertes MDM2 wurde bisher nur in Tiermodellen erprobt, ist aber aufgrund der Expression von MDM2 in Normalgeweben kritisch zu sehen. Dabei könnte zwar ein breiteres Tumorspektrum zum Ziel eines Immunangriffs werden, es könnte aber durchaus auch zu einer Beteiligung von Normalgeweben im Sinne autoimmuner Reaktionen kommen (VOSS et al., 2000).

Aufgrund des von uns nachgewiesenen Expressionsmusters ausschließlich in Testis und Tumoren und der anzunehmenden Immunogenität wäre dieses Fragment des Klonen sub T 37 im Sinne der Fragestellung interessant. Wegen der unvollständigen Sequenz konnte dieser Klon jedoch nicht vollständig charakterisiert werden.

Tumorbiologisch interessant und für Impfstrategien geeignet wären des Weiteren auch weit

exprimierte Antigene (siehe Einleitung Tabelle 2), die immunologisch aber selektiv sein können, und Differenzierungsantigene. Einige Klone, die wir aus der subtraktiven Testis-Bank isoliert haben, weisen Homologien zu fetalen Normalgeweben oder Geweben aus immunprivilegierten Regionen auf (z. B. Gehirn, fetale Leber usw., siehe Ergebnisse Tabelle 1). Diese wurden hier von uns nicht konsequent erfasst bzw. weiter charakterisiert. Bei einzelnen Klonen, die von uns wegen vermutlich nicht rein testisspezifischer Expression ausgeschlossen wurden, könnte es sich allerdings um weit exprimierte Antigene handeln. So könnten für diese Klone quantitative Analysen zur Klärung einer Überexpression oder serologische Untersuchungen z. B. mittels Einsatz des SEREX-Verfahrens aufschlussreich sein.

## **V2. Der Klon sub T 25 als partielles Transkript von humanem Kinesin**

Der Klon sub T 25 wurde insgesamt zweimal aus einer subtraktiven Testis-cDNA-Bank isoliert und kodierte für ein testisspezifisches Kinesin-Protein, welches bis dato nicht vorbeschrieben war. Wie sich erst im Verlauf des Projektes zeigte, stellt unsere Sequenz ein partielles Transkript eines Volllängeklons dar, der für ein testisspezifisches humanes Kinesin-Protein kodiert, was nach Abschluss unserer Arbeit erstmals publiziert wurde. Weder für das humane testisspezifische Volllänge kinesin noch für das hier detektierte kürzere Transkript sub T 25 RACE existierten Daten über Untersuchungen zur Expression in Tumoren oder zur Immunogenität. Diese wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Mit seinem auf Testis und einige Karzinome restringierten Expressionsprofil erfüllt der Klon sub T 25 zumindest die Kriterien für ein Cancer-Germline-Gen. Aufgrund der vorliegenden Daten kann auch eine gleichzeitige Überexpression in Bronchialkarzinomen diskutiert werden, sowie eine low-level-Expression in Normalgeweben, insbesondere in Lunge, ausgeschlossen werden. Über seine Immunogenität, zur eindeutigen Klassifikation als Antigen, kann unseren diesbezüglich negativen Untersuchungsergebnissen zufolge keine Aussage getroffen werden. Unsere Untersuchungen beschränkten sich allerdings auf Immunglobuline der IgG-Klasse. Antikörper anderer Subklassen können also nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund von Prädiktionen bleibt ein immunogenes Potential wahrscheinlich. MHC-I-Liganden (Nonapeptide) und T-Zell-Epitope wurden über SYFPEITHI mit einem hochsignifikanten Score prädiziert. Hier könnten sich weitere Studien anschließen.

International mehren sich Hinweise auf eine immunogene Potenz einiger Kinesin- oder Kinesin-ähnlicher Proteine. Zwischenzeitlich finden sich Publikationen, in denen immunogene

Reaktionen gegen die schweren Ketten von Kinesin postuliert werden. Berichtet wird von einem monoklonalen Antikörper gegen die schwere Kette von Kinesin (MACUREK et al., 2002).

Das hier detektierte kürzere Transkript sub T 25 RACE ist vermutlich ein Teil des Volllängeklons. Es könnte sich aber auch um ein neues Genprodukt handeln.

Der **Klon sub T 25 RACE** entspricht bis auf einige Nukleotidaustausche einem partiellen Transkript der mRNA von humanem Kinesin. Dieses Genprodukt kodiert für ein Kinesin-Protein NYD-KIF2 (ACC.No. AF333335). Sein nach unseren Northern Blot-Analysen zugrundeliegendes testisspezifisches Expressionsmuster steht in Übereinstimmung zu Daten in der Genbank und der Literatur, in der diese Sequenz als testisspezifisch deklariert ist (SHA et al., submitted 2001; bzw. Genbank Acc.No. 333335). Dies konnten wir mit unseren Hybridisierungsergebnissen bestätigen. Assoziationen dieses testisspezifischen Kinesins zu Tumoren waren bis dato nicht beschrieben (LAI et al., 2000). Unseren Untersuchungen zufolge mit dem RACE-Klon sub T 25 wird dieses partielle Transkript erstmals in 2 Bronchialkarzinomen, einem Hodentumor und einem Nebenschilddrüsentumor nachgewiesen.

Den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen zufolge handelt es sich bei Kinesin um ein nukleäres Protein mit regulativer Funktion. Dies stimmt mit Literaturvergleichen überein, nach denen Kinesine zu den DNA-bindenden und Mikrotubuli-assoziierten intrazellulären Proteinen mit vorwiegend nukleärer Lokalisation zählen (HIROKAWA et al., 1998).

Signifikante Homologien zu anderen humanen Kinesinen fanden sich in der Datenbank nicht. Es fanden sich zuvor nur Teilhomologien zu Kinesin-like-Proteinen (Kinesin-like-protein KIF 2 beta (SANTAMA et al., 1998), Mitotic-centromere-associated Kinesin (MCAK) (MANEY et al., 1998), und HK2 Human kinesin-like-protein (DEBERNARDI et al., 1997), die zu einer grossen Kinesin-Familie gehören. In tumorbiologischem Zusammenhang wird das mitotic-centromere-associated-Kinesin als Verursacher von „lagging chromosomes“ beschrieben (MANEY et al., 1998). Dieser Mechanismus wird beispielsweise auch verantwortlich gemacht für die Induktion von Lungenkarzinomen durch Asbestfibern, p21 ras und andere Karzinogene. Immunhistochemischen Untersuchungen zufolge unterbricht eine MCAK-Überexpression die mitotische Spindel.

Seit Mitte der 80er Jahre erstmals ein Kinesin neben Dynein als zellulärer Motor identifiziert wurde (BRADY et al., 1985; VALE et al., 1985), führt die wachsende Anzahl hochhomologer Kinesine mit teils völlig differenten Funktionen, die bisher nur ansatzweise verstanden sind, zu Konfusionen aufgrund ihrer uneinheitlichen Terminologie. Erst kürzlich wurde eine neue Nomenklatur vorgestellt, mit dem Versuch einer Klassifikation aller zu diesem Zeitpunkt



identifizierten Kinesin-Proteine in Maus und Mensch und humanen Genomtranskripten (MIKI et al., 2001). So können wir uns hier auch nur auf einen groben Überblick und die für diese Arbeit relevanten Eigenschaften beschränken.

Zusammenfassend bilden Kinesine eine Familie von überwiegend nukleär oder zytoplasmatisch lokalisierten mechanochemischen Motorproteinen. Ihre Hauptfunktion wird im Vesikel- und Organellentransport angenommen (GOLDSTEIN et al., 2001). Diese Vesikel können dabei auch an verschiedene Rezeptor- und Adaptorproteine angekoppelt werden, und diese und andere Signalproteine zur Plasmamembran transportieren (NAKAGAWA et al., 2000; SETOU et al., 2000). Die zweite entscheidende Funktion besteht scheinbar in der Regulation der Chromosomen und Spindelbewegungen während der Mitose (HEALD et al., 2000) und Meiose, die häufig über DNA-bindende Regionen mit Chromosomen und der Spindel interagieren können (VERHEY et al., 2001).

Literaturangaben zufolge besteht die Kinesin-Familie gegenwärtig aus über 50 Mitgliedern, in Funktion teilweise verwandter und Expression verschiedener Kinesin-Superfamilie-Proteine (KIFs), die sich wiederum in Subfamilien von über 100 verschiedenen Kinesin-like-Proteinen oder Kinesin-related-Proteinen KRP (MIKI et al., 2001) untergliedern. Kinesin-like-Proteine enthalten Aminosäuresequenzen, die zwischen allen bisher studierten Eukaryonten hochkonserviert sind. Fast alle enthalten neben oft zahlreichen anderen funktionellen Domänen die relativ konservierte Kinesin-Motor-Domäne (BLOOM et al., 1995; KULL et al., 1996). Bislang wurden meist sechs konservierte Motive in 106 kompletten Motor-Domänen-Sequenzen gefunden. Die Motor-Domäne besteht aus mehreren flexiblen Untereinheiten, die es erlaubt ihre Konformation funktionsgerecht anzupassen. So befinden sich darin dominant zwei konservierte Sequenzen, ein meist proximales Walker A ATP-bindendes-Motiv als katalytische Domäne und eine Mikrotubuli-bindende Domäne (HIROKAWA et al., 1998). Neben diesem Walker A-Motiv sind sogenannte LAGSE- und IFAY-Sequenzen für den Erhalt der Motorfunktion von funktioneller Bedeutung (NAKAGAWA et al., 1997). Selbst hochhomologe Motor-Domänen differieren so funktionell.

Außerhalb dieser Domäne zeigen die Kinesin-Superfamilie-Proteine wenig Ähnlichkeiten. Die Tail-Region und die 5'- und 3'- Sequenzblöcke vor und hinter der Motorregion unterscheiden sich teilweise erheblich und sind so für die unterschiedliche Expression und Funktion mit verantwortlich (MIKI et al., 2001). Konstante und variable Regionen werden auch hier angenommen (HIROKAWA et al., 1998). Zahlreiche Interaktionen mit anderen Molekülen und Adaptorproteinen finden im wesentlichen in diesen Regionen außerhalb der Motor-Domäne statt

(NAKAGAWA et al., 1997; SETOU et al., 2000; VERHEY et al., 2001).

Innerhalb der Motor-Domäne des Klon sub T 25 finden sich folgende für diese Region charakteristische Motive: Eine ATP/GTP-bindende Site mit einem Walker A-Motiv (WALKER et al., 1982) oder einem P-loop-Motiv findet sich im N-terminalen Bereich der AS 80-90 der Domäne an Position 303-310 und ist als häufiger Bestandteil der schweren Kette verantwortlich für die Motoraktivität des Proteins.

ATP/GTP-bindende Proteine besitzen häufig konservierte Motive. Die am besten konservierten Motive dieser Klasse beinhalten eine Glycin-reiche Region, die typischerweise eine flexible Schleife zwischen einem beta-Strang und einer alpha-Helix bilden, die mit einer der Phosphatgruppen der Nukleotide interagiert. Dieses Schleifenmotiv wird als A-Konsensus-Sequenz oder P-Loop bezeichnet. P-Loop-Motive definieren die Zugehörigkeit zu einer P-Loop-Superfamilie (ORENGO et al., 1994). Relevanz erhalten solche Motive außer in Kinesin-like-Proteinen und Kinesin-Schwerketten (kinesin heavy chain) u. a. auch in der Familie der Thymidinkinasen, der Ras-Familie und Elongations-Faktoren (EF-G usw.). Die C-terminale Hälfte der Motor-Domäne ist in die Mikrotubuli-Bindung involviert. Die Signatur dieser Domäne leitet sich ab von einem konservierten Dekapeptid innerhalb des Mikrotubuli-bindenden Teils, der Kinesin-Motor-Domänen-Signatur (BLOOM et al., 1995) an Position 441-452.

Mittlerweile hat sich eine Einteilung etabliert, die Mitglieder dieser expandierenden Kinesinfamilie nach der Position der Kinesin-Motor-Domäne den N- (NH<sub>2</sub>-terminalen), M- („Middle motor domain type“, (WORDEMAN et al., 1995) mit der Domäne im Zentrum der Sequenz) oder C-Kinesinen (den COOH-terminalen Motor-Domänen-Typ (ENDOW et al., 1991, SAITO et al., 1997)) zuzuordnen.

Die Region der Kinesin-Motor-Domäne wird in der Literatur als hochkonserviert beschrieben. Unmittelbar nach Beginn dieser Region endet an Position 267 die Proteinsequenz von RACE-sub T 25, der damit vermutlich im wesentlichen den variablen 5'-Sequenzblock vor der Motor-Domäne repräsentiert, und der mit für die Testisspezifität ausschlaggebend sein kann.

Die phylogenetische Analyse zeigt viele Parallelen zwischen humanen Kinesinen und denen von Maus und *Xenopus laevis*. So haben 44 von 45 murine KIFs orthologe Sequenzen im Menschen. Dies suggeriert zum einen, dass das Mausmodell möglicherweise gut geeignet ist (BRADY et al., 1985; VALE et al., 1985) und zum zweiten, dass sich aufgrund der konservierten Funktionen der zahlreichen Mitglieder der Kinesin-Familie, daraus mögliche funktionelle Zusammenhänge zu dem Klon sub T 25 ableiten lassen.

Potentiell kann es sich bei dem Klon sub T 25 RACE um ein neues Kinesin handeln. Die Sequenz

von sub T 25 RACE ist bis auf die im Ergebnisteil beschriebenen Nukleotidabweichungen und dem fehlenden C-Ende, identisch zum N-Terminus von Humanem Kinesin (Sha et al., submitted 2001).

Berücksichtigt man die zuvor beschriebene Funktionsweise der konservierten Motor-Domäne und betrachtet man den Sequenzabbruch im RACE-Klon an Position 267 gerade zu Beginn der funktionell bedeutsamen Domäne, ist es denkbar, dass ein solches von sub T 25 RACE kodiertes Protein nur dann seine Motor-Aktivität entfalten kann, wenn sich der Sequenzbereich der Motor-Domäne anschließt, bzw. dass ein Verlust der gesamten Domäne, sowie der Verlust eines partiellen Teils schon zu Funktionsänderungen führen könnte. Nach HIROKAWA et al., 1998, scheint die Motor-Domäne nicht ohne Funktionsverlust in zwei Module aufteilbar. Für diverse Interaktionen sowie für die Mikrotubuli-Bindung und den Konformationswechsel der Zellen während der Mitose mit Ausbildung der Spindel und der Polarisierung der Zentromere wurden die N- bzw. C-terminalen Sequenzbereiche als dominant verantwortlich identifiziert.

Unter der Annahme, dass es sich hier nur um einen Teil des publizierten Volllänge kinesins mit 2,4 kb handeln könnte, könnte auch der Klon sub T 25 RACE zu den M-Kinesinen mit zentraler Positionierung der Motor Domäne gehören. Dies gilt es zu überprüfen.

Da jedoch die Kinesine sich außerhalb der Motor-Domäne stark unterscheiden können, besteht die Möglichkeit, dass das C-terminale Ende des sub T 25-RACE-Klones (0,8 kb) nach der Motor-Domäne bei 1,8 kb von der veröffentlichten humanen Kinesinsequenz (2,4 kb) abweicht. Dafür ergeben sich anhand der hier vorliegenden Daten folgende Hinweise:

Zum einen lassen sich in den vielfach durchgeführten Hybridisierungen mit dem sub T 25 RACE-Klon (der mit 0,8 kb das 5'-Ende und mit 267 Basenpaaren den Beginn der ca. 976 bp langen Motor-Domäne des Volllänge kinesins repräsentiert) in Testis und zwei Bronchialkarzinomen ausschließlich Transkripte bei 1,8 kb detektieren. Das Volllänge kinesin von 2,4 kb wurde niemals erreicht. Dies kann auf eine Genfamilie hinweisen, auf Trunkierung oder Fusionen. Gegen eine Splicevariante des 2,4 kb Kinesins spricht dabei die Exon-Intron-Struktur von humanem Kinesin, das, wie bereits beschrieben, intronlos ist. Zum dritten war es retrospektiv nicht möglich, über RACE-PCR dieses 3'-Ende aus der damaligen subtraktiven Testis-Bank zu amplifizieren. Allerdings ist die Situation in Testis wegen den Differenzierungsvorgängen bei der Spermatogenese zusätzlich komplex (GÜRE et al., 2000) und es lassen sich differenzierungsabhängig eher differente Transkripte detektieren.

Wie aber bemerkt, findet sich dieses 1,8 kb Transkript spezifisch in Bronchialkarzinomen und zeigt damit eine andere Expression gegenüber humanem Kinesin, für das keine Assoziation zu

Tumoren bekannt ist. Es könnte sich auf die Ergebnisse unserer Expressionsanalyse gestützt, um ein neues testisspezifisches Transkript mit Expression in soliden Tumoren handeln, welches für ein partielles Kinesinprotein kodiert, das sich bei vollständiger Motor-Domäne beispielsweise durch den Verlust des Carboxylendes unterscheidet.. Es wäre dann den C-Kinesinen zuzuordnen. Auch andere Sequenzabweichungen wären denkbar. Dies gälte es zu prüfen.

Die Hybridisierungen, die mit dem ursprünglichen 230-bp-Insert von sub T 25 durchgeführt wurden, erwiesen sich als unspezifischer, denn dort imponieren 3 differente Transkriptlängen von 0,8 kb, 1,8 kb und dem Volllänge-klon bei 2,4 kb. Betrachtet man sich die Homologie dieses Inserts zur Gesamtsequenz so erkennt man, dass es sich dabei vor allem um die konservierte Motor-Domänen-Sequenz eines Proteins einer großen Genfamilie handelt. Dies zeigt aber, für den Fall des RACE-Ergebnisses mit immer nur einem Transkript, dass 531 Basenpaare 5'-aufwärts von der Motor-Domänen-Sequenz im 0,8 kb Transkript vermutlich für die Testis- und Tumorspezifität ohne alternative Transkripte unter stringenten Bedingungen schon ausreichen, denn auch dieses Insert zeigt keine Expression in Normalgeweben. Neben den offenbar testisspezifischen 1,8 kb und 2,4 kb-Transkripten, scheint es also noch ein testisspezifisches 0,8 kb Transkript zu geben, das damit der Länge des RACE-Klons entspricht.

Die 8 im Ergebnisteil beschriebenen Nukleotidabweichungen können unterschiedlich diskutiert werden. Es kann sich dabei um eine in ihrer Funktion unwesentlich beeinträchtigte Isoform handeln. Auch ist im Hinblick auf die Vielfalt der Kinesine ein entsprechender Polymorphismus nicht auszuschließen. Auch ein Pseudogen, das nicht translatiert wird, mit vollständigem Funktionsverlust wäre zu diskutieren. Letztendlich könnten sie aus einem Polymerasefehler bei der RACE-PCR oder einem Datenbankfehler resultieren.

Eine Isoform anzunehmen, ist eher unwahrscheinlich, vor allem wenn sich bestätigen sollte, dass der sub T 25 RACE-Klon bzw. das neue 1,8 kb-Transkript zusätzlich zu den Nukleotidabweichungen um ca. 0,6 kb kürzer ist, sich beispielsweise wie zuvor beschrieben am C-terminalen Ende durch den Verlust des Carboxylendes unterscheiden kann. Das Volllänge-kinesin befand sich zum damaligen Zeitpunkt in einem intensiven Charakterisierungsprozess auch anderer Arbeitsgruppen (SHA et al., submitted 2001) und es wurden mehrfach Ergänzungen in der Genbank eingetragen (ACC.No. 333335). Dies macht auch einen Datenbankfehler unwahrscheinlich. Belegt wurde auch dort die Testisspezifität, aber eine Isoform wurde in der Literatur nie angegeben. Grundsätzlich sind zwar Isoformen von Kinesinen in Spermien beschrieben, diese sind aber nicht zu sub T 25 homolog (NAVOLANIC et al., 2000). Ein prozessiertes Pseudogen anzunehmen, würde in Übereinstimmung stehen zu der fehlenden

Expression im pQE-Vektor-System durch *E. coli*. Dies ist aber unwahrscheinlich, denn dort wurde das Volllänge kinesin ligiert und zur Expression angeregt. Es sprechen auch Anhaltspunkte dafür, dass dies eher an der Komplexität des Proteins scheiterte, wie auf den folgenden Seiten erörtert wird oder der gewählte Promotor nicht geeignet war. Ausserdem wurde es transkribiert und ist intronlos.

In Anbetracht der mehrfach überprüften Sequenz des ursprünglichen Inserts von sub T 25 und der vollständigen antisense-Homologie zur identischen Sequenz des Klon sub T 29, der aus der gleichen subtraktiven Testis-Bank isoliert wurde und die beide, PCR-unabhängig, die gleichen Nukleotidabweichungen wie der RACE-Klon zu Kinesin aufweisen, ist ein Polymerasefehler oder ein Sequenzierungsartefakt bei der RACE-PCR aus der subtraktiven Bank als Erklärung dieser Abweichungen eher nicht verantwortlich.

Die Nukleotidabweichungen würden zum Austausch von drei im Ergebnisteil beschriebenen funktionellen Motiven führen, deren Relevanz aber anhand der vorliegenden Daten nicht weit erörtert werden kann. Hier könnten sich Studien anschliessen.

Da die Nukleotidabweichungen in konservierten Bereichen gefunden wurden, können sie sowohl die Expression als auch die Immunogenität beeinflussen. Die Bedeutung zeigt sich auch bei einer Molekülanalyse der Kinesin-Motilität (RICE et al., 1999; PENNISI et al., 2000), für die zusätzlich auch Nukleotidabweichungen innerhalb der konservierten Motor-Domäne verantwortlich sind. In der Motor-Domäne sollen nämlich Veränderungen in der Aminosäuresequenz zu einer anderen Bewegungsrichtung am Zytoskelett führen.

Eine veränderte Motoraktivität von sub T 25 könnte auch die Retention und den Transport von MHC-Klasse-II enthaltenden Kompartimenten beeinflussen. Kinesine sind beschrieben, die sich in beide Richtungen an den Mikrotubuli bewegen (ENDOW et al., 2000). Dies würde die Signaltransduktion beeinträchtigen. Demzufolge liesse sich ein Zusammenhang auf die Induktion einer Immunantwort über CD4+-Zellen, die eine B-Zell-Antwort generieren können, herstellen. Da Interaktionen im B-Zell- und T-Zell-System beschrieben sind, führt dieser Mechanismus möglicherweise auch zu einer Beeinflussung einer Immunantwort über CD8+-Zellen (WUBBOLTS, et al., 1999).

Obwohl der MHC-Komplex polymorph und polygen ist, kann die Veränderung eines Strukturgens dazu führen, dass die Peptide einer Erkennung und einer Bindung durch MHC-I und MHC-II entgehen, und so keine Immunantwort, weder durch CD8+-Zellen, noch durch B-Zellen, hervorgerufen wird. Dies gilt auch umgekehrt. Ein mögliches Peptidmotiv mit einem C-terminalen Ankermotiv wurde im Klon sub T 25 gefunden, welches mit MHC-I-Molekülen

einen geeigneten T-Zell-Liganden ergeben könnte. Jedoch der Austausch einer Aminosäure kann schon dazu führen, dass dieses Stück nicht mehr in der Peptidfurche des MHC-Moleküls verankert werden kann.

Die frequente Expression von sub T 25 in Bronchialkarzinomen begründet seine mögliche Bedeutung für zukünftige Analysen. Warum sub T 25 Kinesin in Bronchialkarzinomen exprimiert oder überexprimiert wird, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Auch die funktionelle Rolle und die Expressionseigenschaften definierter Cancer-Germline-Antigene sind nur ansatzweise verstanden. Ob die hier beobachtete Überexpression auf eine erhöhte Genaktivität oder Genamplifikation zurückzuführen sein kann, oder ob es zur Freisetzung eines intrazellulären Proteins durch Zelluntergang kommt, kann nicht beantwortet werden. Interessant ist die Beobachtung, dass z. B. bei C-Kinesinen die Tail-Domäne als hemmender Regulator der Motor-Domäne beschrieben wird (COY et al., 1999). Konsekutiv kann es bei Fehlen dieser Domäne (wie aufgrund des ORF von sub T 25 RACE möglich) zu einer ungehemmten Motoraktivität kommen. Ob jedoch sub T 25 überhaupt den C-Kinesinen zuzuordnen ist und sein poly-A-Tail fehlt, müsste erst bewiesen werden.

Beide untersuchten Bronchialkarzinome sind als relativ undifferenziert beschrieben und haben demzufolge auch wahrscheinlich einen hohen mitotischen Index, was bei vielen Kinesinen zu erhöhter Expression führen kann. In adulten Organismen finden sich die höchsten Zellteilungsraten in Testis, lymphatischen Geweben und epithelialen Geweben (NAKAGAWA et al., 1997). Die höchsten Kinesinexpressionen finden sich in undifferenzierten proliferierenden Zellen mit hohem mitotischem Index. Mitotische Defekte wurden in Abhängigkeit der Kinesinfunktion beobachtet (MANEY et al., 1998). Strukturelle DNA-bindende Komponenten in Proteinen wie Kinesin können neben ihrer Wirkung auf Chromosomen und die Ausbildung der mitotischen Spindel in Folge auch einen erheblichen Einfluss auf die Zellzyklusprogression ausüben (MARMORSTEIN et al., 2001).

Pathohistologisch unterscheiden sich die beiden Lungenkarzinome. Es handelt sich einmal um ein kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC), das andere gehört zu den nicht kleinzelligen Typen (NSCLC). Es handelt sich hierbei um ein Plattenepithelkarzinom. NSCLC gehen von Bronchialepithel aus, das ohnehin eine relativ hohe Zellteilungsrate hat (MITELMAN et al., 1997). SCLC sind neuroendokriner Herkunft und gehen von APUD-Zellen aus. Charakteristisch sind auch neuroendokrine Marker, die jedoch wie Chromogranin A auch in normalen Zellen exprimiert werden. Nur in Tumorzellen werden SCLC-Genprodukte exprimiert, die sonst nur in embryonalem Nervengewebe vorkommen (hASH). SCLC sind darüber hinaus mit

paraneoplastischen neurologischen Syndromen assoziiert, die mit der aberranten Expression immunogener neuraler Antigene durch die Krebszellen erklärt werden. Die SCLC rechnen aufgrund der Expression multipler neuroektodermaler Antigene zu den hochimmunogenen Tumoren. Ob Kinesin dabei eventuell auch eine Rolle zukommt, kann nicht beantwortet werden. Lungenkarzinome stellen wie die meisten soliden Tumoren eine sehr heterogene Gruppe von Subtypen dar. Hier wurden nur einzelne Gewebe eines jeweils histologischen Typs untersucht. Zu prüfen wäre die Expression von sub T 25 in einer grösseren Gruppe der einzelnen histologischen Subtypen und die Abhängigkeit der Kinesinexpression oder Expression von spezifischen Kinesinanteilen von klinischen Parametern wie Tumorstadium.

Auch die Heterogenität auf zellulärer Ebene müsste berücksichtigt werden. Diverse Gewebearten wie Bronchialmuskulatur, Plattenepithel, Drüsenzellen und neuroendokrine Zellen sind vertreten. Diese enthalten oft nur fokal Herde von Tumorzellen mit Expression eines potentiellen Antigens. Auch die Exploitation des Antikörperrepertoires einer heterogenen Gruppe von Gesunden und Patienten und die Detektion einer humoralen Immunantwort mit autologen Seren von Patienten mit Bronchialkarzinomen wäre interessant.

Auffällig ist in unserer Arbeit eine Koexpression der Cancer-Germline-Antigene NY-ESO-1 und SSX-4 mit der Expression von Kinesin sub T 25 RACE in einem der positiven Bronchialkarzinome. Dies war deshalb bekannt, weil Bronchialkarzinome und Gliome im Rahmen eines parallelen Projektes in Zellkultur untersucht wurden auf bekannte Cancer-Germline-Antigene (NY-ESO-1, SSX-4, SSX-2, SCP-1 und LAGE-1). Korrelationen oder Koexpressionen von Cancer-Germline-Antigenen sind, wie in der Einleitung beschrieben, ein bekanntes Phänomen. Die Expression individueller Mitglieder der Cancer-Germline-Antigene scheint oft einer Koregulation zu unterliegen (BOON et al., 1994). Dies prädestiniert sie auch für die Herstellung polyvalenter Vakzine. Eine mögliche Bedeutung lässt sich anhand der vorliegenden Daten jedoch noch nicht beurteilen.

Das im Volllänge kinesin am C-Terminus liegende Leucine-Zipper-Motiv, das in die Ausbildung von Dimeren und coiled-coil-Strukturen (O'SHEA et al., 1989) involviert ist, unterstreicht einmal mehr die DNA-bindende Funktion der Kinesin-Proteine. Solch ein Strukturmotiv erfüllt besonders die Aufgabe, sich einerseits der asymmetrischen Struktur der Doppelhelix anzupassen und gleichzeitig die spezifischen Nukleotide in der Erkennungssequenz zu identifizieren (WITTMANN et al., 1998). Es ermöglicht auch die axiale Anlagerung zweier Proteine mit entsprechenden Leucine-Zipper-Motiven, die durch reißverschlussartige Interaktionen miteinander nonkovalente Bindungen eingehen, die in vielen Fällen das molekulare Korrelat der

Dimerbildung von Transkriptionsfaktoren darstellen. In Abhängigkeit des vorgeschalteten Promotors differieren die Wirkungen additiv oder subtraktiv. Das Leucin-Zipper Muster ist präsent in vielen eukaryontischen genregulatorischen und DNA-bindenden-Proteinen, wie den C-myc-, L-myc- und N-myc-Onkogenen, dem fos-Onkogen, dem cAMP-response element (CRE) bindenden Proteinen (CREBP) und weiteren Transkriptionsfaktoren (LUPAS et al., 1996). Eine Assoziation von Kinesin zu soliden Tumoren und Leucine-zipper Motiven ist in der Literatur nicht zu finden und wäre erstmals hier beobachtet.

Das Kinesin-Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert (17q22), das in vielen Tumoren amplifiziert wird, beispielsweise in Mammakarzinomen. Auf Chromosom 17 sind auch die BRCA1 und BRCA2 Breast cancer-Gene lokalisiert und weitere. Trotzdem waren zunächst in der Literatur keinerlei Angaben über eine direkte Assoziation zu Tumoren zu finden. Später wurden aber tumorrelevante Zusammenhänge von verschiedenen Arbeitsgruppen hergestellt. Ein Link zwischen dem Tumorsuppressorgen APC und der Kinesin-Superfamilie wurde Literaturangaben zufolge identifiziert (JIMBO et al., 2002). Eine Arbeitsgruppe aus Boston deklarierte durch eine direkte Interaktion mit einem Kinesin-related-Motor einen Einfluss auf Tumorsuppressoren in epithelialen Zellen (ASABA et al., 2002).

Zur eindeutigen Charakterisierung von sub T 25 als Cancer-Germline-Antigen sind serologische Untersuchungen und die Überprüfung der Immunogenität unerlässlich. Da der Versuch eine Expression in *E. coli* zu induzieren und mit Seren eine Immunantwort zu verifizieren, für sub T 25 scheiterte, stellt sich zunächst die Frage, ob das gewählte Expressionsvektorsystem überhaupt geeignet war, das möglicherweise hochkomplexe Protein effizient zu exprimieren. Für die Komplexität spricht hier, dass es sich bei Proteinen, die eine solche vorbeschriebene Kinesin-Motor-Domäne besitzen, Literaturangaben zufolge in vielen Fällen um komplexe oligomere Proteine, mit zwei schweren und zwei leichten Ketten handelt, die nochmals aus mehreren strukturellen Domänen komponiert sind (VALLEE et al., 1990; BRADY et al., 1995).

Vorhersagen zur Proteinfaltung suggerieren eine a/b-Struktur des sub T 25 Produktes bzw. des Volllänge kinesins sowie eine TIM-Fass-Architektur. Der Verlust einer Tail-Domäne führt auch zu einer veränderten Proteinfaltung. Auch die Ausbildung einer Quartärstruktur mit Polypeptidketten wäre denkbar. Die Strukturvergleiche mit ähnlichen Kinesinen, die eine Kinesin-Motor-Domäne enthalten, suggerieren eine Quartärstruktur von Kinesin und den Aufbau aus mehreren Polypeptidketten mit möglicherweise unlimitierter oder variabler Protomerenanzahl (KOZIELSKI et al., 1997; MARX et al., 1998). Dafür sprechen die multiplen Motive, deren Funktion als Nebervalenzen möglicherweise in der Bildung von Disulfidbrücken zur



Stabilisierung einer Tertiär- oder Quartärstruktur liegt, wie fünf Motive für N-Glykosylierungen vermuten lassen (SEEBERGER et al., 2000).

Es wäre deshalb interessant, ein anderes Expressionssystem zu etablieren oder aber erneut den proteinkodierenden Bereich modifiziert in einen pQE-Vektor zu ligieren. Weiter ist aber zu bedenken, dass eine Antikörperantwort gegen verschiedene Domänen von Kinesin, die teils spezifisch teils konserviert und ubiquitär exprimiert werden, eine eingeschränkte Aussagekraft haben könnte. Es wäre deshalb schon im Vorfeld zu überlegen, möglicherweise Proteinbereiche, die hochtitrige unspezifische Antworten hervorrufen könnten, auszuschließen und die spezifischen Bereiche einzugrenzen. Bei diesem erneuten Versuch könnte man die Vorhersagen zur Proteinstruktur berücksichtigen und darauf achten, den hochkonservierten Bereich (der möglicherweise unspezifische AK-Antworten hervorruft) sowie den möglicherweise zur Quartärstruktur führenden Bereich nicht zu translatieren. Man könnte versuchen die Komplexität des Proteins zu verringern. Sollte eine Expression gelingen, könnte die Immunogenität überprüft werden. Inwieweit dies dann auf in vivo Prozesse übertragbar bliebe könnten wiederum nur weitere Studien klären.

Eine weitere Möglichkeit wäre ein Konstrukt zur Untersuchung in einem heterologen System. So könnte man sub T 25 modifiziert in einen retroviralen Vektor transfizieren. Damit könnte möglicherweise eine toxische oder unkontrollierte Expression umgangen werden.

Bei dem Klon sub T 25 besteht die Möglichkeit, dass ein strukturell und in seiner Funktion verändertes Kinesin gleichzeitig verstärkt exprimiert wird. Dies würde es mehrfach interessant machen im Hinblick auf eine mögliche Immunogenität und umso mehr, wenn sich seine Koexpression mit anderen Cancer-Germline-Antigenen, wie in unserer Arbeit mit SSX-4 und NY-ESO-1 belegt, bestätigen sollte, dessen Expression auch in Lungenkrebs bekannt ist und das diesbezüglich schon auf therapeutische Eignung intensiv untersucht wird (JÄGER et al., 1998).

Das Cancer-Germline-Antigen NY-ESO-1 ist in der Literatur als immunogen beschrieben. Es wurden sowohl Antworten über MHC-Klasse-II-abhängige als auch über MHC-Klasse-I-abhängige (VALMORI et al., 2000) Wege erhalten und beispielsweise spezifische HLA-DR-Epitope (ZENG et al., 2000) und HLA-A2-Epitope identifiziert (JÄGER et al., 1998). Eine Impfung mit mehreren Peptiden könnte die Immunogenität erhöhen, da durch ein breiteres Angriffsspektrum auf mehrere Antigene die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass durch Selektion vollständig antigenlose und damit resistente Tumorzellvarianten entstehen (JÄGER et al., 1998).

### V. 3. Perspektiven

Erstrebenswert wäre eine möglichst umfassende Abdeckung des gesamten Tumorspektrums und die Detektion vieler Cancer-Germline-Antigene in einer Tumorentität zur Herstellung polyvalenter wirksamer Impfstoffe. Auch die funktionelle Rolle der Cancer-Germline-Antigene, die man im Zellzyklus vermutet, müsste besser verstanden werden. In der vorliegenden Arbeit wurde vermutlich ein Zellzyklusprotein Kinesin als mögliches Cancer-Germline-Antigen identifiziert.

Während die Expressionsfrequenz vieler Cancer-Germline-Antigene in verschiedenen Tumoren bestimmt wurde, ist immer noch wenig über ihre Koexpression in einem gegebenen Tumor bekannt. In unserer Arbeit gelang es, eine Koexpression eines möglichen Cancer-Germline-Antigens Kinesin mit den bekannten Cancer-Germline-Antigenen NY-ESO-1 und SSX-4 zu dokumentieren. Diese beobachtete Korrelation bedarf einer experimentellen Überprüfung.

Auch im Falle einer Nichtimmunogenität wären in Testis und Tumoren exprimierte Strukturen von tumorbiologischer Relevanz. Die Hoffnung, mittels der hier angewandten modifizierten Identifikationsmethode über die Sequenzierung von Transkripten aus einer subtraktiven Testis-cDNA-Bank neue Cancer-Germline-Antigene zu detektieren und damit Peptide für weitere immuntherapeutische Studien zu definieren, erfüllte sich nicht. Es gelang jedoch, zwei testisspezifische Klone, sub T 25 und sub T 37, mit einer tumorspezifischen Expression zu isolieren. Mit dem Klon sub T 25 wurde ein testisspezifisches Transkript von Kinesin identifiziert und es konnte für dieses eine spezifische Assoziation von Kinesin zu Tumoren gezeigt werden. Der Klon sub T 25 erfüllt so mit seinem Expressionsprofil in Testis, Hodentumoren, Nebenschilddrüsenkarzinomen und einigen Bronchialkarzinomen, Kriterien für ein Cancer-Germline-(Anti)Gen. Die für die Klassifikation als Antigen unerlässliche immunologische Charakterisierung des Klones sub T 25 gelang hier nicht. Die grosse Anzahl kinesinähnlicher Proteine in Normalgeweben, die unspezifische Reaktionen hervorrufen könnten, liessen seinen Nutzen für eine Antitumorthherapie zu diesem Zeitpunkt fraglich erscheinen. Es ist jedoch durchaus denkbar, dass ein Kinesinprotein immunogenes Potential besitzen könnte. In der Zwischenzeit wurden Literaturangaben zufolge immunogene Antworten auf die schweren Ketten von Kinesin-Proteinen nachgewiesen. Monoklonale Antikörper wurden beschrieben, die differente Epitope im Bereich der schweren Ketten eines Kinesin-Moleküls erkennen (MACUREK et al., 2002). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ergeben sich möglicherweise für eine spezifische Therapie von Lungenkarzinomen zukünftig realisierbare

Ansätze. Hier könnte der Versuch, ein neues Expressionssystem für sub T 25 zur Detektion tumorassoziiierter Antikörperantworten zu etablieren, neue Aufschlüsse ergeben. Zu prüfen wäre in diesem Zusammenhang auch die Immunogenität von sub T 25 in der Zellkultur. Die vollständige immunologische Charakterisierung von sub T 25, die spontanen oder assoziierten humoralen und zellulären Immunantworten und das Verständnis seiner Interaktionen sind Grundvoraussetzung zur Abschätzung seiner molekularen Bedeutung. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen könnten weiter dazu beitragen, die subzelluläre Lokalisation von Kinesin und seine Funktion im Zellzyklus, im Signaltransfer und seinen Einfluss auf Proliferationsvorgänge zu verstehen.. So ergeben sich anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Daten neue Fragestellungen, zu deren Beantwortung sich weitere Studien anschliessen könnten. Anwendbare Gen- und Immuntherapien erfordern die molekularbiologische und funktionelle Analyse aller an diesen Prozessen beteiligten Strukturen. Dieser Aufgabe stellen sich im Rahmen des Tumor-Immunoms weltweit viele Institute und Forschungsgruppen, mit dem Ziel alle menschlichen Tumorantigene zu charakterisieren und diese in einem zweiten Schritt auf ihre immuntherapeutische Eignung zu überprüfen. Mit unserer Arbeit können wir hierzu einen bescheidenen Beitrag leisten.

## VI. Bibliographie

1. Adams, R. R., Tavares, A. A., Salzberg, A., Bellen, H. J. and Glover, D. M.: Pavarotti encodes a kinesin- like Protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis. *Genes Dev.* 12 (10), 1483-1494 (1998)
2. Alphey, L. : DNA-Sequencing. Glover, D., Hames, B. D. (Hrsg.) *DNA Cloning I – Core Techniques.* Oxford University Press, 225-260 (1995)
3. Altschul, S. F., Gish, W. , Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. : Basic local alignment tool. *J. Mol. Biol.* 215 : 403-410 (1991)
4. Asaba et al. : Direct interaction with a kinesin-related motor mediates transport of mammalian discs large tumor suppressor homologue in epithelial cells. *J Biol Chem* Dec 21 (2002)
5. Baar, J. : Clinical applications of dendritic cell cancer vaccines. *Oncologist* 4: 140-144 (1999)
6. Bairoch, A., Bucher, P. and Hofmann, K. : The PROSITE database, its status in 1997. *Nucl. Acids Res.* 25, 217-221 (1997)
7. Bakker, A. B. et al. : Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179, 1005-1009 (1994)
8. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J: Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.*; 58: 2825–2831 (1998)
9. Benson, D. A., Boguski, M., Lipman, D. J. and Ostell, J. : GenBank. *Nucleic Acids Res.* 22 : 3441-4 (1994)
10. Birnboim, H. C. and Doly, J. : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513 (1979)
11. Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S. : Sequence and structure based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Jour. Of Mol. Biol.* 294 (5), 1351-1362 (1999)
12. Bloom, G. S. and Endow, S. A. : Motor proteins 1: Kinesins. *Protein Profile* 2 (10), 1105-71 (1995)
13. Boekelheide, K., Lee, J., Shipp, E. B., Richburg, J. H. and Li, G. : Expression of Fas system-related genes in the testis during development and after toxicant exposure. *Toxicol. Lett.* 102-103: 503-508 (1998)
14. Boel, P., Wildmann, C., Sensi, M. L., Brasseur, R., Renauld, J. C., Coulie, P., Boon, Th. and van der Bruggen, P. : BAGE : a new gene encoding an antigen recognized on human

- melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 2, 167-175 (1995)
15. Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. and Van Pel, A. : Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 337-365 (1994)
  16. Brady, S. T. : A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature (London)* 317, 73-75 (1985)
  17. Brass, N., Heckel, D., Sahin, U., Pfreundschuh, M., Sybrecht, G. W. and Meese, E.: Translation initiation factor eIF-4gamma is encoded by an amplified gene and induces an immune response in squamous cell lung carcinoma. *Hum. Mol. Genet.* 6 (1), 33-39 (1997)
  18. Brändle, D., Brasseur, F., Weynants, P., Boon, Th. and Van den Eynde, B. : A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J. Exp. Med.* 183 : 2501-2508 (1996)
  19. Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Wölfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, T. and Boon, Th. : The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T-lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 178, 489-495 (1993)
  20. Chauhan, S. S., Goldstein, L. J. and Gottesman, M. M. : Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res.* 51, 1478-1481 (1991)
  21. Chen, H.X., Gore-Langton, A.E. and Cheson, B.D.: Clinical trials referral resource: Current clinical trials of the anti-VEGF-monoclonal antibody bevacizumab. *Oncology (Williston Park)* Aug 15 (8): 1017,1020, 1023-6 (2001)
  22. Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Türeci, Ö., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M. and Old, L. J. : A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Immunology*, Vol. 94, 1914-1918 (1997)
  23. Cheung, I. Y. and Cheung, N. K. : Molecular detection of GAGE expression in peripheral blood and bone marrow: utility as a tumor marker for neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 3 (5), 821-826 (1997)
  24. Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single step-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162 : 156-159 (1987)
  25. Ciardiello, F., Bianco, R. and Damiano, V. et al. : Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. *Clin Cancer Research* 6: 3739-3747 (2000)
  26. Claverie, J. M. and Makalowski, W. : Alu alert. *Nature* 371 (6500), 752 (1994)

27. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV: Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* ; 6: 443–446 (2000)
28. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D et al.: Efficacy and safety of Herceptin™ (humanized anti-Her2 antibody) as a single agent in 222 women with Her2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer. *Proc Amer Soc Clin Oncol* ; 17: 97a (1998)
29. Coley, W: The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigius*). London: John Bale & Sons Publishers ; 1–48 (1909)
30. Cox, A. L. : Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T-cell lines. *Science* 264, 716-719 (1994)
31. Coy, D. L., Hancock, W. O., Wagenbach, M. and Howard, J. : Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nat. Cell Biol.* 1 (5): 288-292 (1999)
32. Cui, J. and Bystry, J. C. : Melanoma and vitiligo are associated with antibody response to similar antigens on pigment cells. *Arch. Dermatol.* 131: 314-318 (1995)
33. De Backer, O., Arden, K. C., Boretti, M., Vantomme, V., De Smet, C., Czekay, S., Viars, C. S., De Plaen, E., Brasseur, F., Chomez, P., Van den Eynde, B., Boon, Th. and Van der Bruggen, P. : Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res.* 59 (13), 3157-3165 (1999)
34. Debernardi, S., Fontanella, E., De Gregorio, L., Pierotti, M. A. and Delia, D. : Identification of a novel human kinesin-related gene (HK2) by the cDNA differential display technique. *Genomics* 42 (1), 67-73 (1997)
35. Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moquadam, F., Huang, H., Lukyanow, S., Lukyanow, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. and Siebert, P. D. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6025-6030 (1996)
36. Disis, M. L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A. E., Cehn, W., Groner, B., Jeschke, B., Lydon, N., McGlynn, E., Livingston, R. B., Moe, R. and Cheever, M. A. : Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* 54, 16-20 (1994)
37. Domenjoud, L., Fronia, C., Uhde, F. And Engel, W. : Sequence of human protamine 2 cDNA. *Nucleic Acids Res.* 16 (15), 7733 (1988)
38. Domenjoud, L., Kremling, H., Burfeind, P., Maier, W. M. and Engel, W. : On the expression of protamine genes in the testis of man and other mammals. *Andrologia* 23 (5), 333-7 (1991)

39. Ehrlich P: On immunity with special reference to cell life. *Proc R Soc* ; 66: 424–448 (1900)
40. Emmert, D. B., Stoehr, P. J., Stoesser, G. and Cameron, G. N. : The European Bioinformatics Institute (EBI) databases. *Nucleic Acids Res.* 22 : 3445-9 (1994)
41. Endow, S. A. : The emerging kinesin family of microtubule motor proteins. *Trends Biochem Sci* 16 (6), 221-5 (1991)
42. Endow, S. A. and Higuchi, H. : A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules. *Nature* 406 (6798): 913-916 (2000)
43. Falk K, Rotzschke O, Rammensee HG: Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* ; 348: 248–251 (1990)
44. Falk, K., Röttschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H. G. : Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351 (6324) : 290-6 (1991)
45. Fallarino, F., Uyttenhove, C., Boon, T. and Gajewski, T. F. : Improved efficacy of dendritic cell vaccines and successful immunization with tumor antigen peptide-pulsed peripheral blood mononuclear cells by coadministration of recombinant murine interleukin-12. *Int. J. Cancer.* 80 (2): 324-333 (1999)
46. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T et al.: Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* ; 60: 397–403 (1999)
47. Feramisco, J. R., Glass, D. B. and Krebs, E. G. : Optimal spatial requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 255 : 4240-5 (1980)
48. Frohman, M. A., Dush, M. K. and Martin, G. R. : Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts : amplification using a single gene specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 8998-9002 (1988)
49. Gartler, S.M. and Goldman, M. A.: Reactivation of inactive X-linked genes. *Devel. Genet.*, 15: 504-514 (1994)
50. Gaugler, B., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Romero, P., Gaforio, J. J. , De Plaen, E., Lethé, B., Brasseur, F. and Boon, Th. : Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179 : 921-930 (1994)
51. Gissmann, L., Boshart, M., Durst, M., Ikenberg, H., Wagner, D. and zur Hausen, H.: Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J Invest Dermatol*, 83: 26s-28s (1984)
52. Goldstein, L. S. : Kinesin molecular motors: Transport pathways, receptors, and human

- diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (13), 6999-7003 (2001)
53. Goydos, J. S., Patel, M. and Shih, W. : NY-ESO-1 and ctp11 expression may correlate with stage of progression in melanoma. *J Surg Res.* 98 (2): 76-80 (2001)
  54. Greil, R., Egle, A. and Villunger, A. : On the role and significance of Fas (Apo-1/CD95) ligand (FasL) expression in immune privileged tissues and cancer cells using multiple myeloma as a model. *Leuk. Lymphoma* 31 (5-6), 477-490 (1998)
  55. Güre, A. O., Stockert, E., Scanlan, M. J., Keresztes, R. S., Jäger, D., Altorki, N. K., Lloyd, J. O. and Chen, Y. T.: Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 97, Issue 8, 4198-4203 (2000)
  56. Güre, A. O., Türeci, Ö., Sahin, U., Tsang, S., Scanlan, M. J., Jager, E., Knuth, A., Pfreundschuh, M., Old, L. J. and Chen, Y. T. : SSX : a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int. J. Cancer.* 72 (6) : 965-71 (1997)
  57. Hassel, J. R., Kimura, J. H. and Hascall, V. C. : *Annu. Rev. Biochem.* 55 : 539-567 (1986)
  58. Heald, R. : Motor function in the mitotic spindle (comment). *Cell* 102 (4): 399-402 (2000)
  59. Henle, W. and Henle, G.: The Epstein-Barr-Virus (EBV) in Burkitt's Lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Ann Clin Lab Sci*, 4: 109-114 (1974)
  60. Herr W, Wolfel T, Heike M, Meyer zum Buschenfelde KH, Knuth A: Frequency analysis of tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of a melanoma patient vaccinated with autologous tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* ; 39: 93–99 (1994)
  61. Hirokawa, N.: Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519-526 (1998)
  62. Hofmann, K. and Stoffel, W. : Tmbase – A database of membrane spanning proteins segments. *K. Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 347: 166-8 (1993)
  63. Hoon, D. S., Yazuki, D., Hayashida, M. and Morton, D. L. : Melanoma patients immunized with melanoma cell vaccine induce antibody responses to recombinant MAGE-1 antigen. *J. Immunol.* 154, 730-737 (1995)
  64. Horton, P. and Nakai, K. : Better prediction of cellular localization sites with the k nearest neighbor classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 5: 147-52 (1997)
  65. Hunter, T. : Synthetic peptide substrates for a tyrosine protein kinase. *J Biol Chem* 257: 4843-8 (1982)
  66. Itoh, R., Kawamoto, S., Adachi, W., Kinoshita, S. and Okubo, K. : Genomic organization and chromosomal localization of the human cathepsin L2 gene. *DNA Res.* 6 (2), 137-140 (1999)



67. Jäger, E., Gnjjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jäger, D., Karbach, J., Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen Y. T., Ritter, G., Hoffmann, E., Arand M., Old, L. J. and Knuth, A.: Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8<sup>+</sup> T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 24; 97 (22), 12198-203 (2000)
68. Jäger, E., Jäger, D. and Knuth, A. : Strategies for the development of vaccines to treat breast cancer. *Recent. Results Cancer Res.* 152, 94-102 (1998)
69. Jimbo et al. : Identification of a link between the tumor suppressor APC and the Kinesin superfamily. *Nat.Cell Biol.* Apr; 4(4): 323-7 (2002)
70. Jung, S. and Schluesener, H. J. : Human T lymphocytes recognize a peptide of single point-mutated, oncogenic ras proteins. *J. Exp. Med.* 173, 273-276 (1991)
71. Kawakami, Y. et al. : Identification of the immunodominant peptide of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2 restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 180, 347-352 (1994)
72. Kawakami, Y., Robbins, P. F., Wang, R. F. and Rosenberg, S. A.: Identification of tumor-regression antigens in melanoma. *Important Adv. Oncol.*, 3-21 (1996)
73. Kawakami, Y. et Rosenberg, S. A.: Immunobiology of human melanoma antigens MART-1 and gp 100 and their use for immuno-gene therapy. *Int. Rev. Immunol.* 14 (2-3), 173-192 (1997)
74. Kerlavage, A. R. and others: Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377 (6547 Suppl ), 3-174 (1995)
75. Kim, I., Jun, D.Y., Sohn, U. and Kim, Y. H. : Cloning and expression of human mitotic centromere-associated kinesin gene. *Biochim Biophys Acta* 1359 (3), 181-6 (1997)
76. King, J. Kishimoto, A., Nishiyama, K., Nakanishi, H., Uratsuji, Y., Nomura, H., Takeyama, Y. and Nishizuka, Y. : Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5' monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 260: 12492-9 (1985)
77. Kishimoto, T., Kokura, K., Kumagai, Y., Makino, Y. and Tamura, T. : HTF: A b-zip transcription that is closely related to the human XBP/TREB5 and is activated by hepatocellular carcinoma in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 746-751 (1996)
78. Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* ; 256: 495–497 (1975)

79. Kozielski, F., Sack, S., Marx, A., Thormalen, M., Schonbrunn, E., Biou, V., Thompson, A., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. : The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell* 91 (7), 985-994 (1997)
80. Kreil, G. : Occurrence, detection and biosynthesis of carboxy-terminal amides. *Meth. Enzymol.* 106: 218-223 (1984)
81. Kubuschok, B., Cochlovius, C., Jung, W., Schmits, R., Trümper, L., Hartmann, F., Renner, C. and Pfreundschuh, M. : Gene-modified spontaneous Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell lines as autologous cancer vaccines mutated p21 ras oncogene as a model. *Cancer Gene Ther* 7 (9): 1231-4 (2000)
82. Kull, F. J., Sablin, E. P., Lau, R., Fletterick, R. J. and Vale, R. D.: Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* 380, 550-559 (1996)
83. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680-5 (1970)
84. Lai, F., Fernald, A. A., Zhao, N. and Le Beau, M. M.: cDNA cloning, expression pattern, genomic structure and chromosomal location of RAB6KIFL, a human kinesin-like gene. *Gene* 248 (1-2), 117-125 (2000)
85. Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. : The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764 (1988)
86. Lee, L., Wang, R. F., Wang, X., Mixon, A., Johnson, B. E., Rosenberg, S. A. and Schrupp, D. S. : NY-ESO-1 may be a potential target for lung cancer immunotherapy. *Cancer J. Sci. Am.* 5 (1), 20-25 (1999)
87. Lethe, B., Lucas, S., Michaux, L., de Smet, C., Godelaine, D., Serrano, A., de Plaen, E. and Boon, T. : LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int. J. Cancer*, 76, 903-909 (1998)
88. Levine, A. J., Momand, J. and Finlay, C. A. : The p53 tumor suppressor gene. *Nature (London)* 351: 453-456 (1991)
89. Liang, H., Atkins, H. and Lunec, J. : Genomic organization of the human MDM2 oncogene and relationship to its alternatively spliced mRNA's. *Gene* 338 (2): 217-223 (2004)
90. Lim, S. H., Wang, Z., Chiriva-Internati, M. and Xue, Y. : Sperm protein 17 is a novel cancer-testis antigen in multiple myeloma. *Blood* 97 (5): 1508-10 (2001)
91. Liou, H. C., Boothby, M. R., Finn, P. W., Davidon, R., Nabavi, N., Zeleznik-Le, N. J., Ting, J. P. and Glimcher, L. H.: A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter. *Science* 247 (4950), 1581-1584 (1990)
92. Liou, H. C., Eddy, R., Shows, T., Lisowska-Grospierre, B., Griscelli, C., Doyle, C.,

- Mannhalter, J., Eibl, M. and Glimcher, L. H.: An HLA-DR alpha promoter DNA-binding protein is expressed ubiquitously and maps to human chromosomes 22 and 5. *Immunogenetics* 34 (5), 286-292 (1991)
93. Liu, X. F., Helman, L. J., Yeung, C., Bera, T. K., Lee, B. and Pastan, I. : XAGE-1, a new gene that is frequently expressed in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 60 (17): 4752-4755 (2000)
  94. Lotze, M., Custer, M. C., Bolton, E. S., Wiebke, E. A., Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A. : Mechanisms of immunologic antitumor therapy: lessons from the laboratory and clinical applications. *Hum. Immunol.* 28 : 198-207 (1990)
  95. Lupas, A : Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods in Enzymology* 266: 513-525 (1996)
  96. Macurek, L. et al. : Monoclonal antibodies KN-02 and KN-03 against the Heavy Chain of Kinesin. *Hybrid Hybridomics* Dec, 21(6): 457-462 (2002)
  97. Maloney, D. G. et al. : IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 90. 2188-2195 (1997)
  98. Mandel, M. and Higa, A. : *J. Mol. Biol.* 53, 154-162 (1970)
  99. Mandelboim, O. et al. : CTL induction by a tumor associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature* 369, 67-71 (1994)
  100. Maney, T., Hunter, A. W., Wagenbach, M. and Wordeman, L. : Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J. Cell Biol.*, Vol 142 (3), 787-801 (1998)
  101. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, S. : *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory (1982)
  102. Marmorstein, L. Y., Kinev, A. V., Chan, G. K., Bochar, D. A., Beniya, H., Epstein, J. A., Yen, T. J. and Shiekhatter, R. : A human BRCA2 complex containing a structural DNAbinding component influences cell cycle progression. *Cell* 104 (2), 247-257 (2001)
  103. Marx, A., Thormälen, M., Müller, J., Sack, S., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. : Conformations of kinesin: solution vs. crystal structures and interactions with microtubules. *Eur. Biophys. J.* 27: 455-465 (1998)
  104. Middendorf, L. R., Bruce, R. C. et al. : On-line DNA Sequencing using a versatile infrared laser scanner electrophoresis apparatus. *Electrophoresis* 13, 487-494 (1992)
  105. Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K. and Hirokawa, N. : All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 98, Issue 13, 7004-7011 (2001)
  106. Miller RA: Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J*

Med ; 306: 517–522 (1982)

107. Mitelman, et al. : A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet.* Apr 15 Suppl., 417-474 (1997)
108. Mizusawa, S., Nishimura, S. and Seela, F. : Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA Sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. *Nucleic Acids Res.* 14, 1319-1324 (1986)
109. Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K. and Hirokawa, N. : A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* 103, 569-581 (2000)
110. Nakagawa, T., Tanaka, Y., Matsuoka, E., Kondo, S., Okada, Y., Noda, Y., Kanai, Y. and Hirokawa, N. : Identification and classification of 16 new kinesin superfamily (KIF) proteins in mouse genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9654-9659 (1997)
111. Navarro, E., Espinosa, L., Adell, T., Tora, M., Berrozpe, G. and Real, F. X. : Expressed sequence tag (EST) phenotyping of HAT-29 cells: cloning of ser/thr protein kinase EMK1, kinesin KIF3B, and of transcripts that include Alu repeated elements. *Biochim Biophys Acta* 1450 (3): 254-64 (1999)
112. Navolanic, P. M. and Sperry, A.O.: Identification of isoforms of a mitotic motor in mammalian spermatogenesis. *Biol reprod* 62, 1360-1369 (2000)
113. Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. and Schadendorf, D. : Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4, 328-332 (1999)
114. Neumann, E., Engelsberg, A., Decker, J., Storkel, S., Jäger, E., Huber, C. and Seliger, B. : Heterogenous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res.* 58 (18), 4090-4095 (1998)
115. Niehans, G. A., Brunner, T., Frizelle, S. P., Liston, J. C., Salerno, C. T., Knapp, D. J., Green, D. R. and Kratzke, R. A.: Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res.* 57 (6), 1007-1012 (1997)
116. O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., O'Callaghan, J., Collins, J. K. and Shanahan, F. : Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6 (4), 457-463 (1999)
117. Okada, H., Attanucci, J., Giezeman-Smits, K. M., Brissette-Storkus, C., Fellows, W. K., Gambotto, A., Pollack, I. F., Pogue-Geile, K., Lotze, M. T., Bozik, M. E. and Chambers, W.

- H. : Immunization with an antigen identified by cytokine tumor vaccine-assisted SEREX (CAS) suppressed growth of the rat 9L glioma in vivo. *Cancer Res.* 61, 2625-2631 (2001)
118. Old, L. J. : Cancer immunology : the search for specificity – G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 47, 261-275 (1981)
119. Orengo, C. A., Jones, D. T. and Thornton, J. M. : Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* 372, 631-634 (1994)
120. O'Shea et al., (1989)
121. Overwijk, W. W., Lee, D. S., Surman, D. R., Irvine, K. R., Touloukian, C. E., Chan, C. C., Carroll, M. W., Moss, B., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P. : Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a „self“ antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice : requirement for CD4<sup>+</sup>-T-lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (6), 2982-2987 (1999)
122. Park, J. H., Kim, C. J., Lee, L. H., Shin, S. H., Chung, G. H. and Jang, Y. S.: Effective immunotherapy of cancer by DNA vaccination. *Mol-Cells.* 9 (4), 384-391 (1999)
123. Parkin, D. M. et al. (Editors): *Cancer Incidence in five continents*. IARC Scientific Publications No. 143, Lyon (1997)
124. Peace, D. J., Smith, J. W., Disis, M. L., Chen, W. and Cheever, M. : Induction of T cells specific for the mutated segment of oncogenic P21ras protein by immunization in vivo with the oncogenic protein. *J. Immunother.* 14, 110-114 (1993)
125. Peng, Y., Chen, L., Li, C., Lu, W. and Chen, J. : Inhibition of MDM2 by hsp 90 contributes to mutant p53 stabilisation. *J. Biol. Chem.* In print (2001)
126. Pennisi, E. : Cell biology. Kinesin movements revealed. *Science* 287 (5450): 23, 25 (2000)
127. Pfreundschuh, M. : Exploitation of the B cell repertoire for the identification of human tumor antigens. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* Vol 46, Issue 7, 3-7 (2000)
128. Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., Oettgen, H. F. and Old, L. J. : Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 75 : 5122-5126 (1978)
129. Pinna, L. A. : Casein kinase 2: an eminence grise in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* 1054: 267-84 (1990)
130. Plant, M. H. and Laneuville, O. : Characterization of a novel transcript of prostaglandin endoperoxide H-synthase with a tissue specific profile of expression. *Biochem J.* 344, 677-685 (1999)
131. Pless, D. D. and Lennarz, W. J. : Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc*

- Natl Acad Sci USA 74: 134-8 (1977)
132. Poustka, A., Klein, M., Mewes, H. W., Gassenhuber, J. and Wiemann, S. : Direct Submission. Submitted (1999)
  133. Quentin, Y. : The Alu family developed through successive waves of fixation closely connected with primate lineage history. *J. Mol. Evol.* 27 (3), 194-202 (1988)
  134. Ravi, R. et al. : *BJU* 83: 219-221 (1999)
  135. Renner, C., Held, G., Ohnesorge, S., Bauer, S., Gerlach, K., Pfitzenmeier, J. P. and Pfreundschuh, M. : Role of naive and memory T cells in tumor cell lysis mediated by bi-specific antibodies. *Immunobiology* 197 (1): 122-132 (1997)
  136. Renner, C., Jung, W., Denfeld, R., Sahin, U., Trümper, L., Hartmann, F., Pfreundschuh, M. : Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T-cells. *Science*, 264, 833-835 (1994)
  137. Reynolds, T: BRCA1: lessons learned from the breast cancer gene. *J Natl Cancer Inst.* 93 (16): 1200-2 (2001)
  138. Rice, S., Lin, A. W., Safer, D., Hart, C. L., Naber, N., Carragher, B. O., Cain, S. M., Pechatnikowa, E., Wilson-Kubalek, E. M., Whittaker, M., Pate, E., Cooke, R., Taylor, E. W., Milligan, R. A. and Vale, R. D. : A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402 (6763): 778-784 (1999)
  139. Richards, J. M. et al. : *J Clin Oncol* 17, 651-657 (1999)
  140. Romero, P., Corradin, G., Luescher, I. F. and Maryanski, J. L. : H-2Kd-restricted antigenic peptides share a simple binding motif. *J. Exp. Med.* 174: 603-612 (1991)
  141. Rosenberg, S. A. et al.: A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10 (3), 281-287 (1999)
  142. Rost, B. : PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.* 266: 525-39 (1996)
  143. Ruschenburg, I., Kubitz, A., Schlott, T., Korabiowska, M. and Droese, M. : MAGE-1, GAGE-1/-2 gene expression in FNAB of classic variant of papillary thyroid carcinoma and papillary hyperplasia in nodular goiter. *Int J Mol Med* 4 (4): 445-448 (1999)
  144. Sahin, U., Hartmann, F., Senter, P., Pohl, C., Engert, A., Diehl, V., Pfreundschuh, M. : Specific activation of the prodrug mitomycin phosphatase by a bispecific anti-CD30/anti-alkaline phosphatase monoclonal antibody. *Cancer Res.* 50, 6944-6948 (1990)
  145. Sahin, U., Türeci, Ö., Chen, Y. T., Seitz, G., Villena-Heinsen, C., Old, L. J. and Pfreundschuh, M.: Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and

- melanoma: basis for polyvalent CT vaccine strategies (letter). *Int. J. Cancer* 78 (3), 387-389 (1998).
- 146.Sahin, U., Türeci, Ö. and Pfreundschuh, M. : Serological identification of human tumor antigens. *Curr-Opin-Immunol.* 9 (5) : 709-16 (1997)
  - 147.Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, Th., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. and Pfreundschuh, M. : Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92, pp. 11810-11813, *Immunology* (1995)
  - 148.Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491 (1988)
  - 149.Saito, N., Okada, Y., Noda, Y., Kinoshita, Y., Kondo, S. and Hirokawa, N.: KIF $\beta$ 2C is a novel neuron-specific C-terminal type Kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. *Neuron* 18 (3): 425-38 (1997)
  - 150.Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. New York (1989)
  - 151.Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, R. : DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463- 5467 (1977)
  152. Santama, N., Krijnse-Locker, J., Griffiths, G., Noda, Y., Hirokawa, N. and Dotti, C. G. : KIF2 $\beta$ , a new kinesin superfamily protein in non-neuronal cells, is associated with lysosomes and may be implicated in their centrifugal translocation. *EMBO J.* 17 (20), 5855-5867 (1998)
  - 153.Santamaria, I., Velasco, G., Cazorla, M., Fueyo, A., Campo, E. and López-Otin, C. : Cathepsin L 2, a novel human cysteine proteinase produced by Breast and colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 58, 1624-1630 (1998)
  - 154.Scanlan, M. J., Altorki, N. K., Güre, A. O., Williamson, B., Jungbluth, A., Chen, Y. T. and Old, L. J.: Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett.* 150 (2), 155-164 (2000)
  - 155.Scarcella, D. L., Chow, C. W., Gonzalez, M. F., Economou, C., Brasseur, F. and Ashley, D. M. : Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin. Cancer Res.*, 5, 335-341 (1999)
  - 156.Schlichtholz, B., et al. : Analyses of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein. *Br. J. Cancer* 69, 809-816 (1994)

157. Seeberger, C., Mandelkow, E. and Meyer, B. : Conformational preferences of a synthetic 30mer peptide from the interface between the neck and stalk regions of kinesin. *Biochemistry* 39 (41): 12558-67 (2000)
158. Setou, M., Nakagawa, T., Seog, D., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K. and Hirokawa, N. : Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor –containing vesicle transport. *Science* 288, 1796-1802 (2000)
159. Sha, J. H., Zhou, Z. M. and Li, J. M. : Direct Submission. Submitted (2001)
160. Sloane, B. F., Dunn, J. R. and Honn, K. V. : Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. *Science (Washington DC)* 212, 1151-1153 (1981)
161. Sperry, A. O. and Zhao, L. P. : Kinesin-related proteins in the mammalian testes : candidate motors for meiosis and morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 7 (2), 289-305 (1996)
162. Stenner-Liewen, F., Guorong, L., Sahin, U., Türeci, Ö., Koslovski, M., Kautz, I., Liewen, H. and Pfreundschuh, M.: Definition of tumor-associated antigens in hepatocellular carcinoma. *Cancer epidemiology Biomarkers and prevention* Vol. 9, 285-290 (2000)
163. Stockert, E., Jäger, E., Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Gout, I., Karbach, J., Arand, M., Knuth, A. and Old, L. J. : A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J. Exp. Med.* 187: 1349-1354 (1998)
164. Swain S: T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* ; 74: 129–142 (1983)
165. Tabor, S. and Richardson, C. C. : DNA Sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Effect of pyrophosphorolysis and metal ions. *J. Biol. Chem.* 265, 8322-8328 (1990)
166. Takahashi, K., Shichijo, S., Noguchi, M., Hirohata, M. and Itoh, K. : Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res.* , 55 : 3478-3482 (1995)
167. Topalian, S. L., Hom, S. S., Kawakami, Y., Mancini, M., Schwartzentruber, D. J., Zakut, R. and Rosenberg, S. A.: Recognition of shared melanoma antigens by human tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunother.* 12 (3), 203-206 (1992)
168. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Immunoblotting in the clinical laboratory. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27 (8): 495-501 Review (1989)
169. Towler, D. A., Gordon, J. J., Adams, S. P. and Glaser, L. : The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.* 57 : 69-99 (1988)
170. Townsend, A. and Bodmer, H. : Antigen recognition by class-I restricted T lymphocytes.



- Annu. Rev. Immunol., 7: 601-624 (1989)
171. Troussard, X. et al. : Hairy cell leukemia. What is new forty years after the first description? Hematology and Cell Therapy 40. 139-148 (1998)
  172. Trowsdale J: Genomic structure and function in the MHC. Trends Genet ; 9: 117–122 (1993)
  173. Türeci, Ö., Chen, Y. T., Sahin, U., Gure, A. O., Zwick, C., Villena, C., Tsang, S., Seitz, G., Old, L. J. and Pfreundschuh, M. : Expression of SSX genes in human tumors. Int-J-Cancer 77 (1), 19-23 (1998)
  174. Türeci, Ö., Sahin, U. and Pfreundschuh, M. : Serological analysis of human tumor antigens : molecular definition and implications. Mol. Med. Today. 3, 342-349 (1997)
  175. Türeci, Ö., Sahin, U., Schobert, I., Koslowski, M., Schmitt, H., Schild, H. J., Stenner, F., Seitz, G., Rammensee, H. G. and Pfreundschuh, M. : The SSX-2 gene, which is involved in the t (X; 18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. Cancer Res. 56 (20), 4766-72 (1996)
  176. Türeci, Ö., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G. and Pfreundschuh, M. : Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95. pp. 5211-5216, Immunology (1998)
  177. Ullmann, A. and Perrin, D. : The lactose operon. Beckwith, J., Zipser, D. (Hrsg.). Cold Spring Harbor, 143-172 (1970)
  178. Vale, R. D., Reese, T. S. and Sheetz, M. P. : Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell 42, 39-50 (1985)
  179. Vallee, R. B. and Shpetner, H. S. : Motor proteins of cytoplasmatic microtubules. Annu Rev Biochem 59, 909-32 (1990)
  180. Valmori, D., Dutoit, V., Lienard, D., Rimoldi, D., Pittet, M. J., Champagne, P., Ellefsen, K., Sahin, U., Speiser, D., Lejeune, F., Cerottini, J. C. and Romero, P. : Naturally occurring human lymphocyte antigen-A2 restricted CD8<sup>+</sup> T-cell response to the cancer testis antigen NY-ESO-1 in melanoma patients. Cancer Res. 60, 4499-4506 (2000)
  181. Valmori, D., Fonteneau, J. F., Valitutti, S., Gervois, N., Dunbar, R., Lienard, D., Rimoldi, D., Cerundolo, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C., Speiser, D. E. and Romero, P.: Optimal activation of tumor-reactive T cells by selected antigenic peptide analogues. Int-Immunol. 11 (12), 1971-1980 (1999)
  182. Van Baren, N., Chambost, H., Ferrant, A., Michaux, L., Ikeda, H., Millard, I., Olive, D., Boon, T. and Coulie, P. G.: PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. Br. J. Haematol. 102

- (5), 1376-1379 (1998)
183. Van den Eynde, B. J. and Boon, T.: Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 27 (2), 81-86 (1997)
  184. Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van Den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, Th. : A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T-lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647 (1991)
  185. Van Duinen et al., 1988
  186. Verhey, K. J., Meyer, D., Deehan, R., Blenis, J., Schnapp, B. J., Rapoport, T. A. and Margolis, B. : Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol.* 152 (5): F 25-8 (2001)
  187. Von Heinje, G. : *Protein Eng.* 2: 531-534 (1989)
  188. Voss, R. H., Lotz, C., Cellary, A. and Theobald, M. : Targeting p53, hdm2 and CD19: vaccination and immunologic strategies. *Bone Marrow Transplant* 26 Suppl 2: 43-5 (2000)
  189. Walczak, C. E., Mitchison, T. J. and Desai, A. : XKCM1: a Xenopus kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell* 84 (1), 37-47 (1996)
  190. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J. : *EMBO J.* 1: 945-951 (1982)
  191. Wang, R. F., Johnston, S. L., Zeng, G., Topalian, S. L., Schartzenehuber, D. J. and Rosenberg, S. A. : A breast and melanoma-shared tumor antigen: T-cell responses to antigenic peptides translated from different open reading frames. *J. Immunol.* 161: 3596-3606 (1998)
  192. Wittmann, T., Boleti, H., Antony, C., Karsenti, F. and Vernos, I. : Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J Cell Biol.* 143 (3): 673-685 (1998)
  193. Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer Zum Buschenfelde, K. H. and Beach, D. : A p16INK4A-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281-1284 (1995)
  194. Wordeman, L. and Mitchison, T. J. : Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J. Cell Biol.* 128 (1-2), 95-104 (1995)
  195. Wubbolts, R. et al. : Opposing Motor activities of dynein and kinesin determine Retention and Transport of MHC Class II containing compartments. *J Cell Sci.* 112 (Pt6), 785-95

(1999)

196. Yanuck, M., Carbone, D. P., Pendleton, C. D., Tsukui, T., Winter, S. F., Minna, J. D. and Berzofsky, J. A. : A mutant p53 tumor suppressor protein is a target for peptide induced CD8+ cytotoxic T-cells. *Cancer Res.* 53, 3257-3261 (1993)
197. Yoshimura, T., Fujisawa, J. and Yoshida, M.: Multiple cDNA clones encoding nuclear proteins that bind to the tax-dependent enhancer of HTLV-1: all contain a leucine zipper structure and basic amino acid domain. *EMBO J.* 9 (8), 2537-2542, (1990)
198. Zendman, A. J., Cornelissen, I. M., Weidle, U. H., Ruiter, D. J. and van Muijen, G. N. : CTp11, a novel member of the family of human cancer/testis antigens. *Cancer-Res.* 59 (24), 6223-6229 (1999)
199. Zeng, G. and Wang, R. F et al.. : Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules. *Immunol.* 165 : 1153-1159 (2000)
- 200.** Zhang, W. H. : MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy. *Curr Pharm Des* 6 (4): 393-416 (2000)

## **VII. Danksagungen**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Michael Pfreundschuh für sein Interesse, seine Grosszügigkeit, seine Geduld und die Unterstützung danken, die es mir ermöglichte, die Arbeit im onkologischen Labor durchzuführen und abzuschließen.

Zu Dank bin ich auch Herrn PD Dr. Ugur Sahin verpflichtet, dessen Kompetenz ich sehr geschätzt habe und der mir dieses Thema überlassen hat.

Frau Dr. Özlem Türeci danke ich für die fachlich kompetente Beratung und Hinweise in experimentellen Fragen.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Herrn Dr. Dieter Preuss für seine Vorschläge, wertvolle Beratung und abschliessende Betreuung.

Herrn Michael Becker möchte ich für die freundliche Einarbeitung in die molekularbiologischen Grundlagentechniken danken.

Weiter bin ich Frau Evi Regitz für Tipps und Ratschläge zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Frank Neumann danke ich für die Bereitstellung von Zellen.

Auch den Doktoranden Thomas Eberle, Constanze Müller-Lantzsch, Philipp Niemeyer und Carsten Zwick sowie Mitarbeitern aus anderen Arbeitsgruppen danke ich für die nette Zusammenarbeit.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Sandra Frühauf, geboren am 31. Juli 1966  
in Trier-Ehrang  
Eltern: Matthias Frühauf und Renate, geb. Frieden  
Kinder:  
Yannik Matthias Frühauf, geb. am 28. September 1993

### **Schulbildung:**

08/1972 – 06/1974	Grundschule in Kordel bei Trier
08/1974 – 06/1976	Grundschule in Püttlingen-Köllerbach
08/1976 – 06/1982	Staatl. Marie-Luise-Kaschnitz-Gymnasium in Völklingen Abschluß: Mittlere Reife
08/1982 – 06/1984	Höhere Handelsschule in Völklingen Abschluß: Fachhochschulreife
08/1984 – 06/1986	Berufsschule in Saarbrücken Abschluß: Kauffrau im Verlagswesen- und Buchhandel
08/1986 – 05/1989	Staatl. Otto-Hahn-Abendgymnasium in Saarbrücken Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### **Berufstätigkeit:**

08/1984 – 06/1986	Berufsausbildung zur Verlagskauffrau und Volontariat bei der Saarbrücker Zeitung in Saarbrücken
06/1986 – 05/1989	Verlagskauffrau und redaktionelle Mitarbeiterin bei der Saarbrücker Zeitung in Saarbrücken
10/1990 – 12/1997	Freie Mitarbeiterin bei der Saarbrücker Zeitung

### **Dienst:**

08/1989 – 07/1990	Freiwilliges Soziales Jahr in Fachklinik St. Hedwig/Illingen
-------------------	--

### **Hochschulbildung:**

09/1990	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
---------	--

	in Homburg (Testbestenquote Medizinertest 1990)
04/1993 – 03/1996	Unterbrechung des Studiums wegen Mutterschafts- und Erziehungszeit
04/1996 – 03/2000	Weiterführung des Studiums der Humanmedizin in Homburg
04/2000 – 4/2001	Praktisches Jahr in den Unikliniken Homburg
03/2001 – 10/2001	Doktorandin und wissenschaftl. Mitarbeiterin, Medizinische Klinik I, Universität des Saarlandes
10/2001	Ärztliche Prüfung
<b>Ärztliche Tätigkeit:</b>	
12/2001 – 31.05.2003	Ärztin im Praktikum Innere Medizin, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg
06/2003 - 31.12.2004	Assistenzärztin in Weiterbildung zur Fachärztin Innere Medizin, Universitätsklinikum des Saarlandes Homburg
Seit 2005 bis aktuell	Assistenzärztin in Weiterbildung zur Fachärztin Innere Medizin
2009 Anmeldung Facharztprüfung	Med. Klinik II, Marienhaus-Klinikum St. Elisabeth, Saarlouis
<b>Promotion:</b>	
	Experimentelle Doktorarbeit im Onkologischen Labor der Inneren Medizin I / Direktor Prof. Dr. med. M. Pfreundschuh/ Universitätsklinikum des Saarlandes
Überherrs, 20. Juli 2009	